ENTWICKLUNG VON TESTVERFAHREN UND EXPERIMENTE ZUR BEURTEILUNG VON INSEKTIZID - WIRKUNGEN AUF BIENENLARVEN

DISSERTATION

Zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie
der Eberhard - Karls - Universität Tübingen

vorgelegt
von

Dieter Wittmann

aus Tübingen

1982

1981

ENTWICKLUNG VON TESTVERFAHREN UND EXPERIMENTE ZUR BEURTEILUNG VON INSEKTIZID - WIRKUNGEN AUF BIENENLARVEN

DISSERTATION

Zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie
der Eberhard - Karls - Universität Tübingen

vorgelegt
von

Dieter Wittmann

aus Tübingen

1982

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 6. August 1981

Dekan: Prof. Dr. Achim Hager

1. Prüfer: Prof. Dr. Wolf Engels

2. Prüfer: Priv. Doz. Dr. habil. Wulf Ulrich Berthold

Mein besonderer Dank gebührt Herrn Prof. Dr. W. Engels für die Betreuung und gedankliche Anregung während der Durchführung der Arbeit.
Den Herren F. Hertl und G. Staemmler möchte ich für die fachkundigen Ratschläge und die handwerkliche Unterstützung in der Imkerei und Schreinerei danken.

Dem Baden-Württembergischen Ministerium für Ernährung, Landwirtschaft, Umwelt und Forsten danke ich für die finanzielle Unterstützung der Arbeit.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	2
2.	Material und Methoden	10
	I. PRÜFVERFAHREN BEI DENEN DAS INSEKTIZID ÜBER BIENENVÖLKER ODER ISOLIERTE AMMENBIENEN AN DIE LARVEN VERFÜTTERT WIRD	10
2.1.	Prüfverfahren: Insektizidfütterung an Völker in Flugzelten	10
2.1.1.	Zum Prinzip des Testverfahrens	10
2.1.2.	Die Versuchstiere	11
2.1.3.	Die Freiland-Flugzelte	11
2.1.4.	Bienenhaltung in den Flugzelten	12
2.1.5.	Aufzeichnung der Brutnestentwicklung	12
2.2.	Prüfverfahren: Insektizidfütterung an im Brutnest gekäfigte Ammenbienen	12
2.2.1.	Zum Prinzip des Testverfahrens	12
2.2.2.	Ansatz der Brutpflegeeinheiten	13
2.2.3.	Haltung der Brutpflegeeinheiten	14
	II. PRÜFVERFAHREN, BEI DENEN DAS INSEKTIZID DEN LARVEN DIREKT APPLIZIERT WIRD	15
2.3.	Prüfverfahren: Direkte Applikation des Insektizids an Bienenlarven auf Waben in freifliegenden Bienenvölkern	15
2.3.1.	Zum Prinzip des Testverfahrens	16
2.3.2.	Die Beobachtungshütte	16
2.3.3.	Die Beobachtungsbeuten	16
2.3.4.	Zusammensetzung und Dosierung der Insektizidfutterlösung	17
2.3.5.	Applikation der Insektizidfutterlösung	18
2.3.6.	Die Versuchsvölker	19
2.3.7.	Dosierung und Applikation der Insektizidfutterlösung	19
2.3.8.	Auswertung	19
2.4.	Prüfverfahren: Direkte Applikation des Insektizids an in-vitro-aufgezogene Bienenlarven.	20

Seite

2.4.1. Zum Prinzip des Testverfahrens 20
2.4.2. Aufzucht von Arbeiterinnen 21
2.4.3. Das Aufzuchtverfahren 22
2.4.4. Bestimmung der Kastenzugehörigkeit der in-vitro-aufgezogenen Imagines 24
2.4.5. Aufzucht auf Altlarven-Diäten mit Honig- und Pollenzusatz 25
2.4.6. Aufzucht von Arbeiterinnen durch Zwischenfütterung während der kritischen Phase 29
2.4.7. Aufzucht mit hitzebehandelten Gelée royale-Diäten 30
2.4.8. Aufzucht auf Diäten mit reduziertem Gelée royale- Anteil 31
2.4.9. Aufzucht auf einer Diät ohne Hefe-extrakt-Zusatz 33
2.5. Modifiziertes Aufzuchtverfahren zur Bestimmung der LD 50 33
2.5.1. Die Aufzuchtgefäße 33
2.5.2. Das Aufzuchtverfahren 34
2.6. TRACERVERSUCHE ZUR PASSAGE VON ^{14}C-CARBARYL UND ^{14}C-DIFLUBENZURON DURCH AMMENBIENEN 34
2.6.1. Die verwendeten Insektizid-Wirkstoffe 34
2.6.2. Die Versuchsbienen 36
2.6.3. Dosierung und Applikation der Wirkstoffe 36
2.6.4. Präparation der Versuchstiere 37
3. Ergebnisse 39
3.1. Prüfverfahren: Insektizidfütterung an Völker in Flugzelten 39
3.1.1. Sammelaktivität und Verhalten der Bienen in Flugzelten 39
3.1.2. Entwicklung der Brutnester in den Flugzelt-Völkern 40

Seite

3.2. Prüfverfahren: Insektizidfütterung an brutpflegende Ammenbienen 41

3.3. Prüfverfahren: Direkte Applikation des Insektizids an Bienenlarven auf Waben freifliegender Völker 42

3.4. Prüfverfahren: Direkte Applikation des Insektizids an in-vitro-aufgezogene Bienenlarven 47

3.4.1. Aufzucht auf Altlarvendiäten mit Honig-Pollen-Zusatz 48

3.4.2. Larvenaufzucht mit Zwischenfütterung während der kritischen Phase 50

3.4.3. Larvenaufzucht mit hitzebehandelten Gelée royale-Diäten 50

3.4.4. Larvenaufzucht auf Diäten mit reduziertem Gelée royale-Gehalt 51

3.4.5. Larvenaufzucht auf einer Diät ohne Hefezusatz 54

3.4.6. Modifiziertes Aufzuchtverfahren zur Bestimmung der LD 50 56

3.5. Passage von ^{14}C-Carbaryl und ^{14}C-Diflubenzuron durch Ammenbienen 57

3.5.1. Carbaryl 57

3.5.2. Diflubenzuron 58

4. Diskussion 62

4.1. Prüfverfahren: Insektizidfütterung an Völker in Flugzelten 62

4.1.1. Beurteilung des Prüfverfahrens 63

4.2. Prüfverfahren: Insektizidfütterung an auf Brutwaben gekäfigte Ammenbienen 64

4.2.1. Beurteilung des Prüfverfahrens 65

4.3. Prüfverfahren: Direkte Applikation des Insektizids an Bienenlarven auf Waben in freifliegenden Völkern 65

4.3.1. Larventest in Beobachtungsvölkern 65

Seite

4.3.2. Beurteilung des Testverfahrens 67
4.3.3. Larventest in Magazinvölkern 68
4.3.4. Beurteilung des Testverfahrens 70
4.4. Prüfverfahren: Insektizidfütterung an in-vitro-aufgezogene Bienenlarven 70
4.4.1. Beurteilung des Verfahrens 73
4.5. Tracer zur Passage von ^{14}C-Carbaryl ^{14}C-Diflubenzuron durch Ammenbienen 74
4.5.1. Carbaryl 74
4.5.2. Diflubenzuron 76
Zusammenfassung 81

1. Einleitung

Das zunehmende Umweltbewußtsein hat für zahlreiche Bereiche, insbesondere der biologischen Forschung und der land- und forstwirtschaftlichen Praxis, neue Maßstäbe gesetzt. Deutliche Auswirkungen dieses Bewußtseins zeigen sich vor allem im Pflanzenschutz, der durch die Forderungen des Umweltschutzes Denkanstöße erhielt und durch zahlreiche praxisbezogene Untersuchungen auf dem Gebiet der biologischen Schädlingsbekämpfung in neue Bahnen gelenkt wird. Die bisher ausgearbeiteten Methoden der biologischen Schädlingsbekämpfung sind aber bei weitem nicht ausreichend, um z.B. die durch Schädlingsbefall und Krankheiten verursachten Ernteausfälle in einer großräumig angelegten und weitgehend auf Monokulturen ausgerichteten Landwirtschaft unter einer wirtschaftlich vertretbaren Schadensschwelle zu halten. Infolgedessen werden chemische Pflanzenschutzmittel weiterhin mit steigender Tendenz produziert und angewendet. Der Pestizidverbrauch wird sich, Prognosen zufolge, in den Industrieländern bis zum Jahr 2000 verdoppeln, in den Ländern der dritten Welt wird er um das Vierfache ansteigen(nach Global 2000, 1980).

Dieser weltweite Einsatz von Pestiziden, der nicht zuletzt auch durch die Marktinteressen der Hersteller chemischer Schädlingsbekämpfungsmittel mit bestimmt wird, hat in den letzten Jahren vielfach zu Resistenzbildungen in den Schädlingspopulationen geführt. Dem wird durch die Entwicklung neuer Wirkstoffe mit geringfügig abgewandelter chemischer Struktur versucht entgegenzuwirken. Obwohl in den letzten Jahren auch neue Substanzklassen für die Schädlingskontrolle

erschlossen werden konnten (Pyrethroide, Entwicklungshemmer, Insektenhormonanaloga), bleibt die derzeitige Strategie des Pflanzenschutzes ein Krisenmanagement (pest management), das stets neue, selbst produzierte Nebenwirkungen in Kauf nehmen muß. Wesentlicher Bestandteil und notwendige Aufgabe dieses Krisenmanagements ist es daher, Nebenwirkungen auf die Umwelt und auf den Verbraucher landwirtschaftlicher Produkte frühzeitig zu erkennen und ggf. zu verhindern oder zumindest einzuschränken. Eine ständige Weiterentwicklung der Prüfmethoden für die Mittelzulassung und die damit nowendigerweise verbundene Anpassung der gesetzlichen Grundlage für das Zulassungsverfahren für neue Präparate sind daher unumgänglich, wenn den Erfordernissen des Umweltschutzes Genüge geleistet werden soll.

Im Gegensatz zu landwirtschaftlich nutzbaren z.B. entomophagen Insekten wurde dem Schutz der Bienen schon sehr früh eine besondere Aufmerksamkeit geschenkt (siehe Sachsenspiegel und die heutige Gesetzgebung). Dies ist auf die wirtschaftliche Bedeutung der Bienen und auf ihre Stellung im Naturhaushalt zurückzuführen. Zwar hat sich in der Imkerei, z.T. auch mit der Veränderung der Umwelt, ein Wandel vollzogen; als Nutzinsekten nehmen die Bienen jedoch nach wie vor eine Vorrangstellung ein. Heute werden die Bienen insbesondere in Obst-, Ölfrüchte- und Gemüse-Monokulturen als Bestäuber eingesetzt. Da sie im Gegensatz zu anderen blütenbesuchenden Insekten blütenstet sind und schon früh im Jahr in großer Zahl ausfliegen, gewährleisten sie eine sichere und effektive Bestäubung vieler unserer Nutzpflanzen. Darüber hinaus sind sie wichtige Bestäuber von verschiedenen Wild-

pflanzen wie z.B. Eberesche, Schlehe, Faulbaum, Vogelkirsche, Weißdorn und verschiedener Beerensträucher, deren Früchte eine wichtige Nahrungsgrundlage vor allem für Vögel sind.

Aufgrund dieser zentralen Stellung der Bienen können durch Insektizide verursachte Bienenvergiftungen weittragende Folgen für das gesamte Ökosystem haben. Die ersten Berichte über durch Pflanzenschutzmittel verursachte Schäden an Bienenvölkern gehen nach Todd und Mc Gregor (1952) auf das Jahr 1870 zurück. Die Schäden waren durch das damals zur Bekämpfung des Apfelwicklers eingesetzte "Pariser Grün" verursacht worden. Seit dieser Zeit sind durch den gesteigerten Einsatz chemischer Pflanzenschutzmittel Berichte über Bienenvergiftungen keine Seltenheit mehr. Musgrave (1950), Hocking (1950) und Anderson und Atkins (1968) geben einen nahezu vollständigen Überblick über die bis dahin zu diesem Problemkreis veröffentlichte Literatur. Zum gleichen Thema finden sich in der neueren Literatur Veröffentlichungen von Nazer (1974), Stanger und Winterlin (1975), Vidano (1976), Belliardo (1977), Egger (1977) und Gerig (1981). In der Bundesrepublik Deutschland haben in den vergangenen Jahren nicht zuletzt die stets wachsamen und engagierten Imkerverbände in Zusammenarbeit mit der Biologischen Bundesanstalt (BBA) darauf hingewirkt, die Anwendung von Insektiziden durch Gesetze so zu regeln, daß Bienenschäden verhindert werden. Diese Bestrebungen führten 1972 zur "Verordnung zum Schutze der Bienen vor Gefahren durch Pflanzenschutzmittel". Dennoch wurden auch in den folgenden Jahren vor allem von Buchner (1973, Stute (1975), Gnädinger (1976, 1977), Schwenke (1979) und Brasse (1980) Insektizidschäden an Bienenvölkern beschrieben. Da mit einer erheblichen Dunkel-

ziffer zu rechnen ist, kann davon ausgegangen werden, daß diese Meldungen nur einen Teil der tatsächlich aufgetretenen Schäden umfassen. Es bleibt zu hoffen, daß durch die weitreichende Schulung und Aufklärung der Landwirte und Kleingärtner und die Überwachung der Anwendung von Pflanzenschutzmitteln, die durch die Pflanzenschutzämter vorgenommen wird, das Ausmaß der Bienenschäden in Zukunft reduziert werden kann.

Eine weitere wesentliche Voraussetzung hierfür ist die Prüfung der für den Handel vorgesehenen Pflanzenbehandlungsmittel auf Bienengefährlichkeit durch die BBA. Das Gesetz zum Schutz der landwirtschaftlichen Kulturpflanzen (1937), das die Grundlage für die Mittelprüfung durch die damalige Biologische Zentralanstalt (heutige BBA) bildete, ist daher in den vergangenen Jahrzehnten mehrmals erweitert und verbessert worden. Dieses Gesetz, das 1949 in das Gesetz zum Schutze der Kulturpflanzen überging, enthielt bereits die Möglichkeit, Vorschriften über den Schutz und die Verwendung von Tieren und Kleinlebewesen, die für den Pflanzenschutz nützlich sind, zu erlassen. Aufgrund dieser Regelung wurde die Verodnung über bienengefährliche Pflanzenschutzmittel (1950), die eine Kennzeichnung aller bienengefährlichen Pflanzenschutzmittel forderte, eingeführt. 1955 entstand hieraus die Vorschrift der amtlichen Prüfung von Pflanzenschutzmitteln auf Bienenschädlichkeit (1972 durch den Begriff Bienengefährlichkeit ersetzt), die erst durch eine weitere Änderung (1969) eine obligatorische Prüfung aller Pflanzenschutzmittel forderte. Durch die darauf folgende Gesetzesänderung (1971) wird auch die Prüfung von Zusatzstoffen in das Zulassungsverfahren einbezogen. Seit 1975 werden auch

sog. Wachstumsregler in die Prüfung einbezogen. Wachstumsregler und Pflanzenschutzmittel werden seither unter dem Begriff Pflanzenbehandlungsmittel zusammengefaßt.

Testverfahren, mit denen verschiedene Wirkungen (Kontaktgift - Fraßgift - Atemgiftwirkung) von Pflanzenbehandlungsmitteln auf imaginale Bienen überprüft werden können, wurden von zahlreichen Autoren beschrieben (Maurizio und Schenker, 1957; Rousseau, 1957; Atkins, 1958; Palmer Jones, 1958; Wiese, 1958; Beye, 1959; King, 1959; Lukoschus und Stein, 1960; Maurizio, 1960; Johansen, 1961; Wafa, 1963; Beran, 1965; Graves und Mackensen, 1965). Die derzeit von der BBA für die Bundesrepublik Deutschland als gültig erklärten Prüfmethoden gehen auf die von Drescher et al. (1975) ausgearbeiteten "Vorläufigen Richtlinien zur Überprüfung von Pflanzenschutzmitteln auf Bienengefährlichkeit" zurück.Diese Richtlinien wurden von Stute et al. (1980) überarbeitet und an die in anderen Ländern üblichen Prüfmethoden angepaßt, so daß nunmehr international vergleichbare Testverfahren zur Prüfung von Pflanzenbehandlungsmitteln auf Bienengefährlichkeit vorliegen. Diese Testverfahren sind ausschließlich für die Prüfung der Wirkung von Pflanzenbehandlungsmitteln an imaginalen Bienen abgestimmt.

In den vergangenen Jahren sind jedoch mehrmals Pflanzenbehandlungsmittel-Vergiftungen auch an der Bienenbrut beobachtet worden (Buchner, 1970, 1973,; Stute, 1975; Gnädinger, 1976, 1977; Egger, 1977; Schenke, 1979). Da derartige Schäden vom Imker bei Routinekontrollen der Bienenvölker leicht übersehen werden können, ist anzunehmen, daß sie weit häufiger auftreten, als bisher angenommen wurde. Hinzu kommt, daß in

der letzten Zeit mehrere Insektizide mit spezifisch larvizider Wirkung in den Handel gekommen sind (sog. Insect growth regulators = IGRs). Da diese Wachstumshemmer im Vergleich zu den bisher üblichen breit wirksamen, neurotoxischen Insektiziden nur äußerst geringe Wirkung auf Wirbeltiere haben und ihr Einsatz ökologisch akzeptabler erscheint, muß davon ausgegangen werden, daß der Marktanteil dieser Insektizide in den kommenden Jahren stark zunehmen wird.

Es erscheint daher notwendig, vorrangig neue Testverfahren zu entwickeln, mit denen speziell larvizide Wirkungen von Insektiziden und anderen Agrochemikalien auf Bienenlarven geprüft werden können. Bei der Entwicklung derartiger Prüfmethoden muß berücksichtigt werden, auf welchem Wege im Freiland ausgebrachte Insektizide an die Bienenbrut gelangen können: Von den Sammelbienen eingetragene kontaminierte Tracht wird zunächst durch die trophallaktische Weiterverfütterung in den Futterstrom des gesamten Volkes eingeschleust. Auf diesem Wege gelangt der Giftstoff nach einer nicht festzulegenden Anzahl von Verdünnungsschritten entweder in die Futtervorräte auf den Waben, oder er wird von den Ammenbienen an die Brut verfüttert. Dabei fungiert die Ammenbiene als Verteiler, über den der Giftstoff auf 2 denkbaren Wegen an eine Larve gelangen kann:

1. Kontaminiertes Futter oder Futtervorräte, also Honig oder Pollen, werden an die Larven verfüttert. Solches gifthaltiges Futter ist dann aus der Honigblase einer oder mehrerer Stockbienen in die der Amme gelangt. Von dort wird es regurgitiert und an die Larve abgegeben. Mit Honigblaseninhalt werden vornehmlich Arbeiterinnen- und Drohnenlarven

der Stadien 4 und 5 versorgt. Die Giftwirkung dürfte somit in erster Linie auf diese älteren Stadien beschränkt bleiben. Mit einer chemischen Veränderung der toxischen Substanz ist hierbei nicht zu rechnen, da die Honigblase an Enzymen fast nur Invertasen enthält.

2. Kontaminierter Futtersaft wird an die Larven verfüttert. In diesem Falle muß die Ammenbiene das kontaminierte Futter zunächst gefressen haben. Über ihren Stoffwechsel können dann ggf. Giftstoffe in das Sekret der Futtersaftdrüsen gelangen, mit dem Arbeiterinnen- und Drohnenlarven der Stadien 1 - 3 sowie Königinnenlarven aller Stadien gefüttert werden. In der Amme können zwischen Resorption und Sekretion metabolische Effekte die Giftwirkung verändern. Neben einer Verstärkung der Giftwirkung oder einer Entgiftung sind dabei auch synergistische Wirkungen zwischen dem Wirkstoff und seinen Metaboliten denkbar.

In der vorliegenden Arbeit wurden mehrere Prüfmethoden auf ihre mögliche Eignung als Testverfahren für die Prüfung der Wirkung von Pflanzenbehandlungsmitteln auf Bienenbrut untersucht. Diese Verfahren lassen sich in 2 Gruppen einteilen:

I. Verfahren, bei denen das Insektizid über Bienenvölker oder isolierte Ammen an die Larven verfüttert wird.
   1. Prüfverfahren: Insektizidfütterung an Völker in Flugzelten.
   2. Prüfverfahren: Insektizidfütterung an im Brutnest gekäfigte Ammenbienen.

II. Prüfverfahren, bei denen das Insektizid den Larven direkt appliziert wird.

3. Prüfverfahren: Direkte Applikation des Insektizids an Bienenlarven auf Waben freifliegender Völker
4. Prüfverfahren: Direkte Applikation des Insektizids an in vitro-aufgezogene Bienenlarven.

Da bisher unklar ist, welche Bedeutung einer möglichen Verfütterung von Wirkstoff-Metaboliten durch die Ammenbienen beim Zustandekommen von Brutschäden zukommen kann, wurde exemplarisch die Passage von 2 Insektizid-Wirkstoffen durch adulte Bienenarbeiterinnen im Ammenalter untersucht:

Tracerversuche zur Passage von ^{14}C-Carbaryl und ^{14}C-Diflubenzuron durch Ammenbienen.

Im folgenden werden alle Darstellungen nach den oben genannten methodischen Ansätzen gegliedert.

2. Material und Methoden

I. PRÜFVERFAHREN BEI DENEN DAS INSEKTIZID ÜBER BIENENVÖLKER ODER ISOLIERTE AMMENBIENEN AN DIE LARVEN VERFÜTTERT WIRD.

2.1 Prüfverfahren: Insektizidfütterung an Völker in Flugzelten

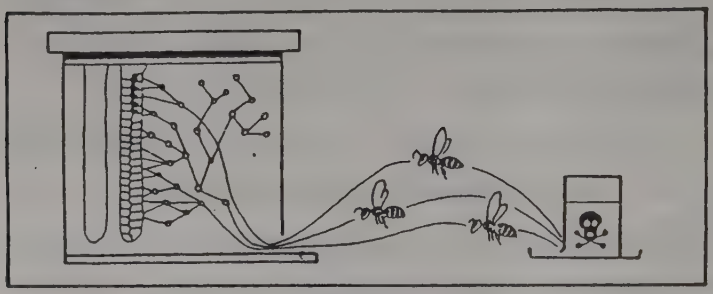

Abb. 1: Das Prinzip des Testverfahrens. Erläuterungen im Text

2.1.1. Zum Prinzip des Testverfahrens

In einzargigen Magazinbeuten gehaltene Bienenvölker werden in vegetationsfreien Flugzelten aufgestellt. An Futterstellen wird den Bienen gemahlener Pollen, Zucker-Honigwasser und Wasser angeboten. Die zu prüfende Substanz wird dem Futter beigemengt. Bevor die Bienen in den Zelten aufgestellt werden, wird für jedes Volk die spontane Brutausfallrate bestimmt. Hierzu werden auf den Brutwaben Beobachtungsflächen von je 50 Zellen mit Larven bekannten Alters abgesteckt. Die Anzahl der abgestorbenen Larven wird nach dem Verdeckeln der Zellen bestimmt. Zur Bestimmung der Brutausfallrate unter Flugzeltbedingungen werden erneut Beobachtungsflächen abgesteckt. Anschließend wird für 24 Stunden insektizidhaltiges Futter angeboten. Sind die Zellen der überlebenden Larven verdeckelt, wird die Anzahl offen gebliebener Zellen bestimmt. In Langzeitversuchen wird das Insektizid über mehrere Tage angeboten, wobei täglich neue Beobachtungsflächen abzustecken sind.

Zur Erfassung von Spätfolgen wird die Beobachtung täglich neu abgesteckter Flächen bei nicht kontaminiertem Futterangebot über mehrere Tage fortgesetzt. Sollen insektizidbedingte morphologische Aberrationen erfasst werden, so werden die Waben nach dem Verdeckeln in Brutschränke umgehängt, wo sie bis zur Kontrolle der schlüpfenden Bienen verbleiben.
Ziel der im folgenden beschriebenen Untersuchungen war es, den Einfluß von Fütterungs- und Haltungsbedingungen in Flugzelten auf das Verhalten von Bienen zu prüfen. Exakte Messungen und die Beurteilung von Insektizidschäden an der Brut sind nur dann durchführbar, wenn davon ausgegangen werden kann, daß die Versuchsvölker in einem Flugzelt-Prüfverfahren Pflegeleistungen vollbringen, die eine mit Freilandvölkern vergleichbare Entwicklung der Brutnester garantiert.

2.1.2. Die Versuchstiere

Die Königinnen der verwendeten Bienenvölker gehörten der Rasse Apis mellifica carnica an. Da sie jedoch auf verschiedenen Belegstellen begattet wurden, waren die Bienenvölker genetisch nicht einheitlich. Die Verwendung derartiger Mischvölker bietet den Vorteil, daß besondere Anfälligkeiten oder Resistenzen, die in reinen Zuchtlinien auftreten können, nicht zu erwarten sind.

2.1.3. Die Freiland-Flugzelte

Die Rahmen der beiden verwendeten Flugzelte (380 cm x 190 cm x 190 cm) bestehen aus zusammensteckbaren Vierkant-Metallrohren (System Dexion). Sie sind mit einer bienendichten Gaze (Fa. Scheibe, Oberursel, Art. Nr. 2095) mit einer Maschenweite von 1 mm überzogen. Die Flugzelte waren auf einer Terrasse des Bienengartens der Universität Tübingen (Südhang) aufgestellt. Die von den Flugzelten überdeckte Fläche war bis auf einige auflaufende Gräser vegetationsfrei.

2.1.4. Bienenhaltung in den Flugzelten

Drei gleichstarke Bienenvölker wurden von einem 9 km entfernten Außenstand zum Versuchsbienenstand transportiert. Je eines dieser Völker wurde in die beiden Flugzelte eingestellt. Das dritte Volk diente als Kontrolle und wurde unmittelbar neben den Flugzelten aufgestellt. In den Flugzelten wurde den Völkern an je einer wettergeschützten Futterstelle 200 g gemahlener Pollen, Zuckerwasser (3:2) mit Honigzusatz und Wasser ad libidum angeboten. Das Futter wurde täglich erneuert.

2.1.5. Aufzeichnung der Brutnestentwicklung

Zu Beginn der Untersuchungen wurden allen Völkern die Brutwaben entnommen und die Ausdehnung der Brutfläche auf beiden Wabenseiten in Übersichtsphotos festgehalten. Hierzu wurde eine Polaroid-Schnellbildkamera mit Stativ und Beleuchtungsanlage (Polaroid Land Camera MP4) verwendet. Anschließend wurden auf den Brutwaben Beobachtungsfelder von je 50 Zellen, die Larven der Stadien 2, 3 und 4 enthielten, mit Nadeln abgesteckt. Nach dem Verdeckeln der Zellen wurden diese Felder kontrolliert und die fehlenden Larven ausgezählt. Während 3 Wochen wurde die Entwicklung der Brutnester in 6tägigen Abständen aufgezeichnet. Die Aufzeichnung des Brutnestes im Kontrollvolk wurde in gleicher Weise vorgenommen. Alle Waben wurden so markiert, daß sie nach der Bonitierung an ihre ursprüngliche Position in der Beute zurückgehängt werden konnten.

2.2. Prüfverfahren: Insektizidverfütterung an im Brutnest gekäfigte Ammenbienen

2.2.1. Zum Prinzip des Testverfahrens

In einem freifliegenden Bienenvolk wird auf einer Brutwabe, die neben einer bestimmten Anzahl Larven auch Honig und Pollen enthält, eine bekannte Anzahl von Ammen-

bienen gekäfigt. Einem solchen Brutabteil muß genügend Flüssigkeit zur Verfügung gestellt werden. Zur

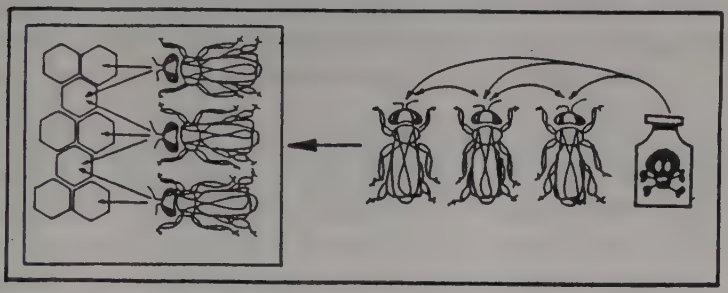

Abb. 2. Prinzip des Testverfahrens. Erläuterungen im Text

Durchführung der Prüfung wird das in Honigwasser gelöste Insektizid an eine Gruppe von Ammenbienen verfüttert. Die Ammen werden bis zur gleichmäßigen Verteilung der aufgenommenen Futtermenge (Kloft et al. 1976) gekäfigt gehalten und dann unter einem Doppelgitterkäfig zu den Larven auf die Brutwabe gesperrt. So kann ein Futteraustausch mit dem Restvolk verhindert werden. Nach 24 Stunden wird die Anzahl der abgestorbenen Larven bestimmt. Die überlebenden Larven werden für eine normale Weiterfütterung freigegeben, die kontaminierten Ammen werden aus dem Volk entfernt. Nach dem Verdeckeln der Larven wird die endgültige Brutausfallrate bestimmt. Diese wird gegen die Mortalität in einer entsprechend gehaltenen, jedoch ohne Insektizidzusatz gefütterten Kontrollgruppe korrigiert.

2.2.2. Ansatz der Brutpflegeeinheiten

Die Pflegebienen für die Versuchsgruppen wurden einem starken und gut brütenden Bienenvolk entnommen. Hierzu wurde eine Brutwabe, auf der sich große Flächen offener Brut befanden, vor dem Flugloch der Beute aufgestellt, um den Sammelbienen Gelegenheit zum Abfliegen zu geben. Nach 15 Minuten wurden die auf der Wabe verbliebenen Bienen abgesammelt. Von ihnen konnte angenommen werden,

daß sie einen repräsentativen Querschnitt der pflegenden Ammen darstellten. Je 100, 200 und 300 dieser Bienen wurden zu einer Gruppe von 100 Larven der Stadien L2, L3 und L4 auf der Versuchswabe gekäftigt. Diese Wabe stammte stets aus dem gleichen Volk, aus dem auch die Pflegebienen abgesammelt worden waren.

Diese Versuche wurden ohne Insektizidfütterung durchgeführt. Ziel der Untersuchung war es, ein für die Brutaufzucht optimales Verhältnis von Ammen und Larven zu finden.

2.2.3. Haltung der Brutpflegeeinheiten

Als Versuchsbereiche wurden stets Stellen auf der Wabe

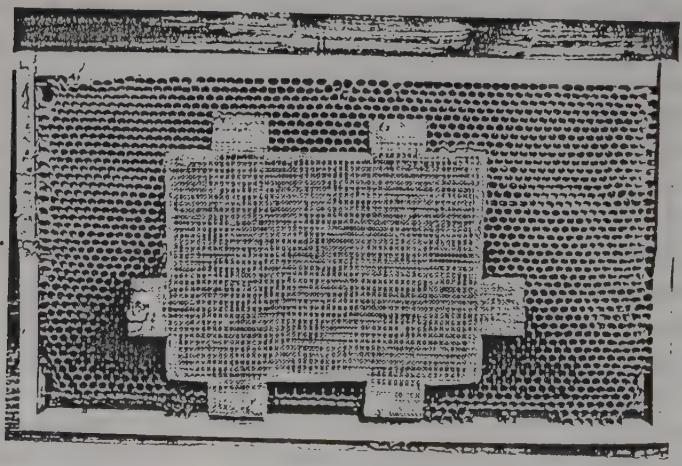

Abb. 3: Käfig mit dem die Ammenbienen auf die Brutwabe gesperrt werden. Der mit Honig benetzte Käfig wurde 2 Tage vor Versuchsbeginn auf die Wabe gesteckt, um die Bienen daran zu gewöhnen. Während dieser Zeit waren die Klappen geöffnet, so daß die Brut unter dem Käfig gepflegt werden konnte. Das engmaschige Drahtgitter verhindert einen Futteraustausch mit den Stockbienen.

gewählt, auf denen sich in unmittelbarer Nähe der Larven Honig- und Pollenvorräte befanden. Um eine bessere Annahme des Doppelgitterkäfigs zu gewährleisten, wurde dieser mit Honig bestrichen und zwei Tage vor Versuchsbeginn über den Versuchsbereich gesteckt. Der Käfig (17 cm x 13 cm x 3 cm) besteht aus einem stabilen weitmaschigen (5 mm) Drahtgitter und einem daraufgelöteten feinmaschigen (0,5 mm) Gitter. Auf diese Weise kann bei der Insektizidfütterung ein Futteraustausch zwischen der Ammenversuchsgruppe und dem Restvolk vermieden werden. An den Seiten und in der Decke des Käfigs befinden sich verschließbare Öffnungen (Abb. 3), durch die die Stockbienen während der Gewöhnungszeit an die Larven gelangen und diese pflegen können. Nach 2 Tagen wurden überzählige Larven entfernt, so daß sich zu Versuchsbeginn 100 Larven unter dem Gitter befanden. Durch eine der Öffnungen im Käfig wurden die Ammen zu den Larven eingeschleust. Jeder Gruppe wurden 2 mit 12 ml Wasser gefüllte Glasröhrchen beigegeben. Die Versuchsgruppen wurden für 24 h im freifliegenden Volk gehalten. Bei der anschließenden Kontrolle wurden die nicht gepflegten bzw. verhungerten Larven ausgezählt.

II. PRÜFVERFAHREN, BEI DENEN DAS INSEKTIZID DEN LARVEN DIREKT APPLIZIERT WIRD

2.3. Prüfverfahren: Direkte Applikation des Insektizids an Bienenlarven auf Waben in freifliegenden Bienenvölkern

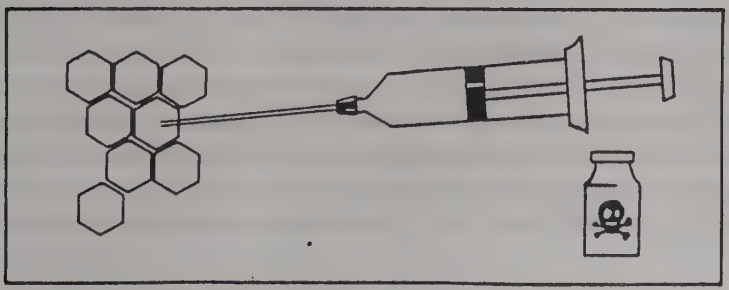

Abb. 4: Prinzip des Testverfahrens. Erläuterungen im Text.

2.3.1. Zum Prinzip des Verfahrens

Das Verfahren beruht auf der direkten Applikation der Prüfsubstanz in Zellen mit offener Brut bekannten Alters. Pro Wabenseite werden Flächen von 50 bzw. 100 Zellen mit Larven bekannter Stadien als Testbereich abgesteckt. Pro Larve werden 10 µl Testgemisch mit einer Dosierpipette verabreicht. Nach dem Verdeckeln der Zellen werden die leeren Zellen ausgezählt. Die mittlere Mortalitätsrate in den Versuchsgruppen wird gegen die Brutausfallrate in Kontrollgruppen korrigiert.

Das Testverfahren wurde sowohl in Beobachtungsvölkern, die in einer Hütte aufgestellt wurden, als auch in Magazinvölkern auf seine Eignung geprüft.

Bei allen Untersuchungen zu diesem Testverfahren wurde DIMILIN 25 WP (Philips Duphar) als Beispiel eines Insektizids mit spezifisch larvizider Wirkung verwendet.

Larventest in Beobachtungsvölkern

2.3.2. Die Beobachtungshütte

Auf einer Terrasse des Bienengartens der Universität Tübingen wurde eine fensterlose und durch Styropor wärmeisolierte Holzhütte (4,20 m x 3,40 m x 2,10 m) errichtet. Durch je ein Loch in der Süd- bzw. Westwand, das über einen kurzen Schlauch mit der Beute verbunden ist, konnten die Bienen ein- und ausfliegen.

2.3.3. Die Beobachtungsbeuten

Zwei Beobachtungsbeuten der Fa. Nenninger wurden so umgebaut, daß die Sichtscheiben der Kästen, störungsfrei, gegen einen mit Klarsichtfolie bespannten Holzrahmen ausgetauscht werden können. Die obere Führungsleiste der Glasscheibe wurde so weit abgeschliffen, daß die Scheibe nach oben aus ihrer Führung gezogen werden konnte. Drückt man den mit Klarsichtfolie bespannten Holzrahmen fest auf die Glasplatte auf, so kann diese langsam nach oben herausge-

zogen werden, ohne daß die Bienen wesentlich gestört werden oder entkommen können (Abb. 5).

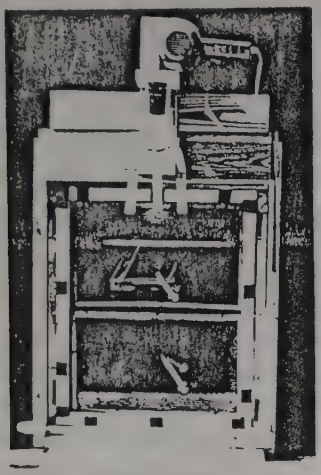

Abb. 5: Eine der für die Untersuchungen umgebauten Beobachtungsbeuten. Anstelle der Glasscheibe ist der mit Klarsichtfolie bespannte Holzrahmen eingesetzt. Durch ein Fenster in der Folie wird das Testgemisch den einzelnen Larven im Testareal appliziert. Mit einem Gitter werden die Stockbienen während der Applikation aus dem mit Stecknadeln begrenzten Testareal ferngehalten. Die Brutnesttemperatur wird mit einem Haarföhn auf 34 ° C gehalten.

2.3.4. Zusammensetzung und Dosierung der Insektizid-Futterlösung

Entsprechend der vom Hersteller angegebenen Aufwandmenge wurde eine 0,3 % Suspension (3 000 ppm) von DIMILIN 25 WP mit destilliertem Wasser angesetzt. Von dieser Stammlösung wurden durch Zugabe von verdünntem Gelée royale (20 ml Gelée royale, 2,5 ml Glucose, 2,5 ml Fructose in 14,5 ml destilliertem Wasser), ein Testgemisch mit 212,0 ppm DIMILIN 25 WP (bezogen auf das Gewicht der Gelée royale Lösung) hergestellt.

2.3.5. Applikation der Insektizid-Futterlösung

Bei den Untersuchungen in den Beobachtungsvölkern wurde DIMILIN in einer hohen Dosierung (212 ppm) an die Larven verfüttert. Hierzu wurden auf den Waben der Beobachtungsstöcke 7 Felder von 50 Zellen mit Larven der Stadien L 2, L 3 und L 5 mit Nadeln abgesteckt. Die Ammen wurden mit einem Gitter, das durch die Folie gesteckt wurde, aus dem Versuchsbereich ausgesperrt. Die Folie über dem Gitter wurde ausgeschnitten. Mit einer Dosierpipette (Fa. Eppendorf) wurden 10 µl Testgemisch pro Zelle zum Larvenfutter gegeben. An die Kontrollgruppen wurde Testgemisch ohne Insektizidzusatz verfüttert.

Während der gesamten Bearbeitungsdauer wurde die Brutnesttemperatur mit Warmluft aus einem Föhn auf 34-35 °C gehalten. Nachdem die Zellen mit dem Testgemisch beschickt waren, wurde die Folienöffnung wieder geschlossen und der Versuchsbereich freigegeben. Anschließend wurde die Folie, der besseren Wärmeisolation wegen, durch die Glasscheibe ersetzt und die Völker mit isolierten Deckfenstern verschlossen. Sämtliche Manipulationen wurden bei Rotlicht durchgeführt. Bei der Applikation wurden die einzelnen Zellen mit einer Schwanenhalsleuchte angestrahlt.

Die Auswertung erfolgte einen Tag nachdem die überlebenden Larven verdeckelt waren. Ausgezählt wurden die offen gebliebenen Zellen, die entweder ausgefressen waren oder abgestorbene Larven enthielten. Außerdem wurden die verdeckelten Zellen geöffnet, um abgestorbene, aber von den Bienen noch nicht ausgeräumte Larven bzw. Vorpuppen zu erfassen.

Larventest in Magazinvölkern

In mehreren Versuchsserien wurde geprüft, inwieweit sich das Verfahren der direkten Larvenfütterung als Testmethode für Serienuntersuchungen in Magazinvölkern eignet.

2.3.6. Die Versuchsvölker

Verwendet wurden 9 Bienenvölker (Apis mellifica carnica), die in Magazinbeuten mit 2 Zargen gehalten wurden. Die Völker besetzten 17 - 18 Waben, davon waren 6 - 7 Brutwaben. Während des Untersuchungszeitraumes wurde den Völkern, zusätzlich zum natürlichen Trachtangebot, Zukkerwasser (3:2) abgeboten.

2.3.7. Dosierung und Applikation der Insektizid-Futterlösung

Durch Zugabe von verdünntem Gelée royale (s. S. 7) zu der 0,3% wässrigen DIMILIN-Stammlösung wurden Testgemische in 6 verschiedenen Verdünnungen hergestellt (4,4; 8,9; 10,0; 11,8; 14,2; 17,9 ppm DIMILIN 25 WP). Die 6 Testgemische wurden in insgesamt 37 Versuchsserien mit je ca. 50 Larven geprüft.

Für die Applikation wurde jeweils eine Brutwabe für kurze Zeit dem Volk entnommen und bienenfrei gemacht. Auf ihr wurden, wie bereits beschrieben, Beobachtungsfelder mit je ca. 50 Larven (L2, L3, L4) abgesteckt. Die Anzahl leerer Zellen wurde notiert. Pro Larve wurden 10 µl Testfutter mit einer Dosierpipette zum Restfutter in die Zelle gegeben. In 16 Kontrollserien wurde Testgemisch ohne DIMILIN-Zusatz verabreicht. Außerdem wurde in 19 unbehandelten Kontrollen die spontane Brutausfallrate ermittelt.

Alle notwendigen Arbeitsschritte wurden so rasch wie möglich durchgeführt, um größere Störungen des Brutgeschäftes der Völker zu vermeiden.

2.3.8. Auswertung

Nach dem Verdeckeln der Zellen wurden die offen gebliebenen Zellen sowie alle toten Larven bzw. Puppen in den verdeckelten Zellen gezählt. Als Mortalitätsrate wurde der Anteil der insgesamt zwischen Applikation und Puppenstadium abgestorbenen Tiere gewertet. Von den pro Konzentrations-Serie errechneten Mortalitäts-Mittelwerten wur-

de die durchschnittliche Brutausfallrate in den Kontrollserien ohne DIMILIN-Zusatz abgezogen. Die so korrigierten Werte für den DIMILIN-bedingten Brutausfall wurden auf Wahrscheinlichkeits-Papier (Fa. Schleicher und Schüll, Nr. 298 1/2 A) aufgetragen. Für die gefundenen Werte wurde die Regressionsgerade errechnet. Von ihrem Schnittpunkt mit der 50 %-Linie läßt sich der Fußpunkt ermitteln, der den LC5o-Wert darstellt (Cavalli-Sforza 1964).

2.4. Prüfverfahren: Direkte Applikation des Insektizids an in-vitro-aufgezogene Bienenlarven

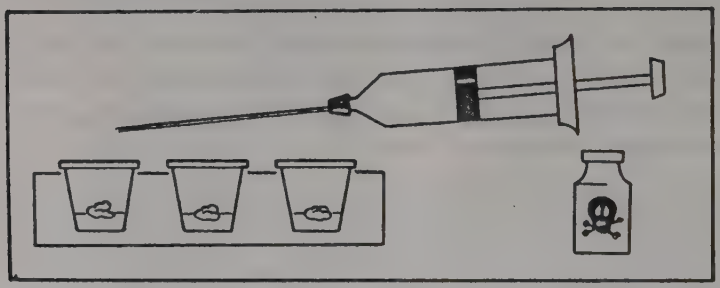

Abb. 6: Prinzip des Testverfahrens. Erläuterungen im Text.

2.4.1. Zum Prinzip des Testverfahrens

Bienenlarven werden in Fingerhüten auf halbsynthetischer Diät aufgezogen. Dieser Diät kann das Insektizid in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt werden. Seine Toxizität kann für jedes der 5 Larvenstadien bestimmt werden. Haben die Larven das gewünschte Stadium erreicht, so wird die Diät abgesaugt und durch kontaminiertes Futter ersetzt. Dieses Testfutter wird für 24 Std. angeboten und anschließend wieder durch die Diät ersezt. Vom Beginn der Insektizidfütterung bis zum Erreichen des Puppenstadiums wird die Anzahl abgestorbener Tiere aufgezeichnet. Von der mittleren Mortalitätsrate im Versuch wird die durchschnittliche Ausfallrate in der Kontrolle abgezogen. Mit diesem Verfahren läßt sich die LC5o eines Insektizids bestimmen. Zur Ermittlung der LD5o muß die an-

gebotene Menge Testfutter so bemessen werden, daß sie von den Larven eines bestimmten Stadiums in einer vorgegebnen Zeit vollständig aufgenommen werden kann. Die hierzu notwendigen Modifikationen des Verfahrens werden in Kapitel 2.4.9. beschrieben.

2.4.2. Aufzucht von Arbeiterinnen

Bei im Freiland durch Insektizide verursachten Brutschäden an Bienenvölkern werden vor allem Arbeiterinnen-Larven betroffen. Vorrangiges Ziel bei der Entwicklung eines in-vitro-Prüfverfahrens war es daher, eine für die Aufzucht von Arbeiterinnen geeignete Diät zu finden.

Im Bienenvolk werden Arbeiterinnen- und Königinnenlarven während ihrer ersten Lebenstage von den Pflegebienen mit Futtersaft versorgt, der in der Menge und im Inhalt kastenspezifische Unterschiede aufweist (Johannson und Johannson 1958, Shuel und Dixon 1960, Townend und Shuel 1962, Rembold et al. 1964, Haydak 1964). Dies hat nachweisbare Unterschiede im Stoffwechsel, im Hormonhaushalt und im Wachstum der jungen Larven zur Folge (Weiss 1971, Rembold 1974). Dennoch ist es einem weisellosen Volk möglich, aus Arbeiterinnenlarven, die nicht älter als 3 Tage sind, Königinnen aufzuziehen. Daß es umgekehrt auch gelingt, durch Umsetzen in Arbeiterinnenzellen, aus Königinnen, die älter als 3 Tage waren, Arbeiterinnen aufzuziehen, konnte Weiss (1978) zeigen. Ausschlaggebend für die Entwicklung zur Arbeiterin ist die Futterumstellung nach dem 3. Tag der Larvenentwicklung. Von diesem Zeitpunkt an erhalten Arbeiterinnenlarven, im Gegensatz zu Königinnenlarven, neben Sekreten der Hypopharynxdrüsen ein Pollen-Honiggemisch aus der Honigblase (Jung-Hoffmann 1967). Bei der in-vitro Aufzucht wurde daher versucht, diese Umstellung in der Ernährung nachzuvollziehen. In diesem Zusammenhang wurden bereits 1977 und 1978 9 verschiedene Diäten geprüft. Diese Untersuchungen wurden mit 27 weiteren Futtermischungen fortgesetzt.

Hierbei wurden 4 verschiedene Wege eingeschlagen:

1. Aufzucht auf Altlarvendiäten mit Pollen und Honigzusatz.
2. Unterbrechung der Gelée royale-Fütterung während der für die Kastendetermination kritischen Phase (4. Tag).
3. Aufzucht auf Altlarven-Diäten mit hitzebehandeltem Gelée royale-Anteil.
4. Aufzucht auf Altlarven-Diäten mit reduziertem Gelée royale-Anteil.

2.4.3. Das Aufzuchtverfahren

Die Aufzuchtgefäße

Dietz (1966) und Rembold (1974) geben für die Larvenaufzucht zwei unterschiedliche Methoden an. Nach Dietz können die Larven, zu je 5 Stück in Uhrgläschen auf 2 ml Diät schwimmend, aufgezogen werden. Die Mitarbeiter von Rembold benützen als Aufzuchtgefäße Fingerhüte, die, jeweils 60 Stück, in einem perforierten Plastikrähmchen stecken.

Die Larvenaufzucht wurde nach dieser Methode durchgeführt. Wegen der besseren Wärmeisolation wurden die Fingerhüte während der Larvenaufzucht in Polyuretan-Blöcken (22,5 cm x 14,0 cm x 3,0 cm) aufbewahrt, in die 60 Löcher gebohrt waren, die mit Lüftungsschlitzen untereinander verbunden sind. Die Fingerhüte werden in diese Löcher eingesteckt und mit einer Glasplatte abgedeckt. Vorher werden sie, um Verletzungen der Larven zu vermeiden, mit einem Skalpell von Graten und Unebenheiten gesäubert. Die dabei anfallenden Plastikspäne werden mit Druckluft ausgeblasen.

Fütterung mit Junglarven-Diät

Bis zum Beginn des 4. Tages der Larval-Entwicklung wurden alle Larven mit der von Rembold et al. (1974) beschriebenen Diät gefüttert. Diese halbsynthetische Diät basiert auf einem Anteil von Gelée royale, dem eine wässrige Zukkerlösung mit Hefeextrakt beigemengt wird:
20 g Gelée royale,
2,5 g Fructose,

2,5 g Glucose,
14,5 g aqu. dest und
0,5 g Difco-Hefe-Extrakt.

Die Fingerhüte werden mit je 2 ml dieser Diät gefüllt. Anschließend werden die Larven aus einer Brutwabe, mittels einer in der Königinnenzucht gebräuchlichen Umlarvnadel, in die Fingerhüte umgesetzt. Für die Aufzucht wurden ausschließlich Larven ausgewählt, die älter als 24 Stunden waren. Bis zum Streckmadenstadium werden die Larven in einem Brutschrank bei 35 ^{o} C und 95 % rel. Luftfeuchte gehalten. Täglich wird, wenn kein Diätwechsel erfolgt, 2 mal ca. 1 ml der Diät nachgefüttert. Dabei muß darauf geachtet werden, daß die Stigmen der Larven nicht vom Futter verklebt werden. Es empfiehlt sich, das Futter von der Seite der Fingerhüte einlaufen zu lassen. Ein Eintauchen der Pipette ins Futter, also eine Zufütterung von unten, ist nicht ratsam, da die Larven in diesem Falle auf dem älteren, weniger flüssigen Futter verbleiben. Dies erschwert ihre Nahrungsaufnahme und lässt sie in der Entwicklung zurückbleiben.

Umsetzen auf die Versuchsdiäten

Zur Bestimmung des Zeitpunktes für den Futterwechsel wurde die Anzahl der von jeder Larve durchgeführten Häutungen aufgezeichnet. Hierzu wurde vor jeder Fütterung der Futtersaft um die Larven nach Exuvien abgesucht. Sie lassen sich unter einem Binokular bei 30-facher Vergrößerung leicht als matt glänzende Häutchen auf der Futteroberfläche erkennen. Waren insgesamt 3 Häutungen vollzogen, von denen die erste, da sie noch vor dem Umlarven stattfindet, nicht beobachtet werden kann, so wurde die Junglarven-Diät abgesaugt. Hierzu wurde eine Pipette verwendet, die über einen Schlauch mit einer Wasserstrahlpumpe verbunden ist. Bei diesem Vorgang können die Larven sehr leicht verletzt oder mit abgesaugt werden. Deshalb sollte die Pipettenspitze bis auf eine kleine Öffnung zugeschmolzen werden. Anschließend wurden 2 ml der Ver-

suchsdiät zugegeben. Täglich wurde 2 mal nachgefüttert. Am letzten Tag (6.) der Entwicklung wurden die Larven mehrmals kontrolliert. Bei denjenigen, die sich im Fingerhut aufstellten, bzw. mit dem Verspinnen begannen, wurde das Futter abgesaugt. Diese Streckmaden wurden in einen 2. Brutschrank mit 34 °C und 65 % rel. Luftfeuchte umgestellt. Diese Maßnahme erweist sich als notwendig, da bei zu hoher Luftfeuchte die Verpuppung in den meisten Fällen unterbleibt. Die geschlüpften Imagines wurden bis zur Bestimmung der Kastenzugehörigkeit im Gefrierschrank aufbewahrt.

2.4.4. Bestimmung der Kastenzugehörigkeit der in-vitro aufgezogenen Imagines

Nach Rembold et al. (1976) und Weiss, (1978) können die Form der Mandibel und die Anordnung der Borsten auf der Innenseite der Hinterbein-Basitarsen als Kastenmerkmale herangezogen werden. Aufgrund dieser Kriterien läßt sich eine Klassifizierung in Königinnen (A), Intermediärstadien (B, C, D) und Arbeiterinnen (E) vornehmen.

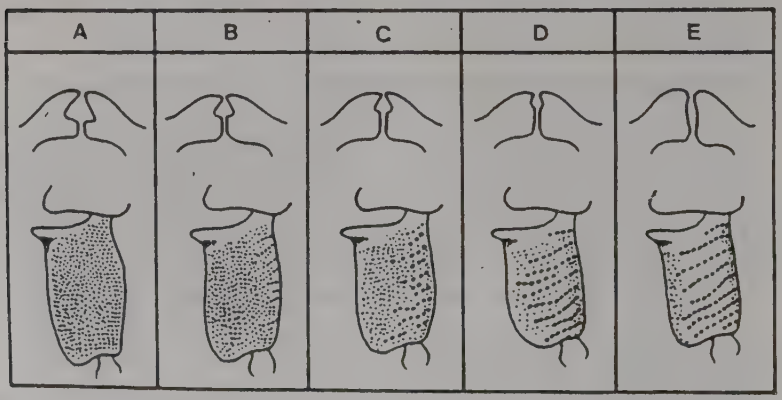

Abb. 7: Schema für die Klassifizierung der verschiedenen Kasten und Intermediarstadien aufgrund der Morphologie der Mandibel und der Behaarung der Hinterbein-Barsitarsen. A = Königin, B, C, D = Intermediärformen (Intercasts); E = Arbeiterin.

Zur Bestimmung der Kastenzugehörigkeit wurden die Bienen auf einem Wachsblock so aufgespannt, daß die Mandibeln und die Innenseite der Hinterbeine bei 30-facher Vergrößerung begutachtet werden konnten. Die Zugehörigkeit zu den 5 Klassen wurde in % der pro Aufzuchtserie geschlüpften Imagines ausgedrückt.

Im Folgenden werden die Untersuchungen zu den 4 Aufzucht-Methoden im einzelnen beschrieben.

2.4.5. Aufzucht auf Altlarven-Diäten mit Honig- und Pollenzusatz

Bei der Zusammensetzung der Diäten wurde davon ausgegangen, daß die Vorverdauung des Pollens durch die Ammenbienen eine notwendige Voraussetzung für dessen weitere Verwertbarkeit durch die Larve darstellt. Nach Kroon et al. (1974) geschieht das Aufbrechen der Pollenkörner durch einen osmotischen Schock beim Übergang der Nahrung vom Honigmagen in den Mitteldarm der Ammenbiene. Dabei dringt im Honigmagen, aufgrund des dort herrschenden hohen osmotischen Druckes, Zucker in die Pollenkörner ein. Beim Übergang in den Mitteldarm, dessen osmotischer Druck geringer ist, (er entspricht nach Kroon dem einer 18 % Fructoselösung) platzen die Exinen durch das nun eintretende Wasser auf. Diese Vorgänge können im Labor nachvollzogen werden.

100 g Pollenhöschen wurden in 200 ml wässriger Honiglösung (1 : 1) 4 Stunden lang gerührt. Die Honiglösung wird mit einer Nutsche abgefiltert. Um den restlichen Honig zu entfernen, wird der Pollen zwischen Filterpapierbögen mehrmals kräftig ausgepresst. Wird der Pollen nun in 100 ml Insektenringer gerührt, so werden die Exinen durch den osmotischen Schock aufgebrochen und die Polleninhaltsstoffe freigesetzt. Dieser Vorgang läßt sich unter dem Mikroskop beobachten (Wittmann, 1978). Die Pollen-Ringer Suspension wird kurz zentrifugiert (200 g/3 Min), bis sich die Exinen abgesetzt haben. 35 g des Überstandes wurden mit 85 g Honig zu einer Honig- Pollenextrakt-Lösung

weiterverarbeitet. Mit dieser Futterlösung wurde eine Reihe von 8 Diäten angesetzt, bei denen der Gelée royale--Anteil um jeweils 1 g herabgesetzt, der Extrakt-Anteil dagegen um 1 g erhöht war. Um eine für die Futteraufnahme günstige Viskosität zu erreichen, wurden jeder Diät 3 ml dest. Wasser zugesetzt.

Die folgenden Diäten wurden an je 2 Serien Larven getestet:

Diät 1

2,5 g Fructose
2,5 g Glucose
19 g Gelée royale
16 g Honig-Pollen-Extrakt
3 ml aqu. bidest

Diät 2

2,5 g Fructose
2,5 g Glucose
18 g Gelée royale
17 g Honig-Pollen-Extrakt
3 ml aqu. bidest.

Diät 3

2,5 g Fructose
2,5 g Glucose
17 g Gelée royale
18 g Honig-Pollen-Extrakt
3 ml aqu. bidest.

Diät 4

2,5 g Fructose
2,5 g Gucose
16 g Gelée royale
19 g Honig-Pollen-Extrakt
3 ml aqu. bidest.

Diät 5

2,5 g Fructose
2,5 g Glucose
16 g Gelée royale
20 g Honig-Pollen Extrakt
3 ml aqu. bidest

Diät 6

2,5 g Fructose
2,5 g Glucose
14 g Gelée royale
21 g Honig-Pollen-Extrakt
3 ml aqu. bidest

Diät 7

2,5 g Fructose
2,5 g Glucose
13 g Gelée royale
22 g Honig-Pollen-Extrakt
3 ml aqu. bidest

Diät 8

2,5 g Fructose
2,5 g Glucose
12 g Gelée royale
23 g Honig-Pollen-Extrakt
3 ml aqu. bidest

Da mit der Diät Nr. 5 gute Aufzuchtraten erzielt werden konnten, wurden mit ihr 5 weitere Serien durchgeführt. An die Larven in den Kontrollgruppen wurde die von Rembold beschriebene Diät verfüttert. In jeweils 2 Wiederholungsserien wurden außerdem die Diäten 3, 4 und 5 in geringen Abwandlungen nochmals geprüft. Den Diäten wurde dabei 0,1 ml einer von Rembold (1974) beschriebenen Vitaminlösung zugesetzt:

Diät 9

2,5 g Fructose
2,5 g Glucose
17 g Gelée royale
18 g Honig-Pollen-Extrakt
3 ml aqu. dest.
0,1 ml Vitaminlösung

Diät 10

2,5 g Fructose
2,5 g Glucose
16 g Gelée royale
19 g Honig-Pollen-Extrakt
3 ml aqu. bidest
0,1 ml Vitaminlösung

Diät 11

2,5 g Fructose
2,5 g Glucose
16 g Gelée royale
20 g Honig-Pollen Extrakt
3 ml aqu. bidest
0,1 ml Vitaminlösung

Vitaminlösung nach Rembold et al. (1974) (g in 100 ml H_2O)

4,0 Ca-Pantothenat
0,18 Titamin HCl
0,36 Riboflavin
0,10 Pyridoxin HCl
0,05 Folsäure
0,05 Biotin
0,0004 Vitamin B 12
3,6 Inositol
3,6 Nicotinsäure
10,0 Cledin HCl
6,0 L-Lysin
6,0 L Arginin

2.4.6. Aufzucht von Arbeiterinnen durch Zwischenfütterung während der kritischen Phase

Weiss (1978) konnte aus seinen Versuchen zur Kastendetermination schließen, daß Arbeiterinnenlarven im Hinblick auf ihre Umstimmbarkeit in vollwertige Geschlechtstiere 3 Phasen durchlaufen:

1. Die sensible Phase. Sie dauert bis zum Ende des 3. Larventages. Bis zu diesem Zeitpunkt sind die Larven bipotent, das heißt, es ist möglich die Determination zur Königinnen- oder Arbeiterinnenkaste durch das weiterhin angebotene Futter zu beeinflussen.
2. Die kritische Phase. In dieser Phase, die mit dem 4. Tag der Larvalentwicklung beginnt, ist es nicht mehr möglich, durch das Angebot von Königinnenfutter reine Geschlechtstiere aufzuziehen. Statt dessen können neben reinen Arbeiterinnen verschieden ausgeprägte Intermediärstadien entstehen.
3. Die fixierte Phase. Sie beginnt am 5. Tag der Larvalentwicklung. Ab diesem Zeitpunkt ist eine Beeinflussung der Kastendetermination durch die Art des angebotenen Futters nicht mehr möglich.

Ausgehend von diesen Befunden wurde geprüft, inwieweit es möglich ist, Arbeiterinnen aufzuziehen, indem den Larven während der kritischen Phase ein Futter angeboten wird, das keine oder nur sehr wenig Komponenten der Futterversorgung einer Königin enthält.

Die Larven wurden bis zur Futterumstellung zu Beginn des 4. Tages mit der Junglarvendiät aufgezogen. Während der kritischen Phase erhielten sie ein "Zwischenfutter", das kein oder sehr wenig Gelée royale enthielt. Nach 24 Stunden wurde wieder die Ausgangsdiät verfüttert. In je 2 Serien wurden folgende Diäten an jeweils 60 Larven verfüttert:

Diät 12

3,5 g Fructose
3,5 g Glucose
18 g Honig-Pollen-Extrakt
O,2 ml Vitaminlösung

Diät 13

3,5 g Fructose
3,5 g Glucose
18 g Honig-Pollen-Extrakt
5 g Gelée royale
O,5 g Difco Hefeextrakt

2.4.7. Aufzucht mit hitzebehandelten Gelée royale-Diäten

Weaver (1955) schloß aus seinen in-vitro Aufzuchtversuchen, daß Gelée royale einen labilen und leicht flüchtigen "Königinnen-Determinator" enthalten müsse. Trifft dies zu, so sollte es möglich sein, diesen "Determinator" durch Erhitzen zu inaktivieren. Mit einer derartigen Diät aufgezogene Larven sollten sich demnach ausschließlich zu Arbeiterinnen entwickeln. Um dies zu überprüfen wurden 2 Diäten angesetzt, deren Gelée royale-Anteil entweder zum Teil oder vollständig durch Erhitzen auf 60 ^{o} C (10 Min.) denaturiert war. Die Diäten wurden ab dem 4. Tag an die Larven verfüttert. Mit jeder Diät wurden 2 Aufzuchtserien a 60 Larven durchgeführt.

Diät 14

2,5 g Fructose
2,5 g Glucose
20 g Gelée royale, davon 10 g denaturiert
15 ml aqu. bidest

Diät 15

2,5 g Fructose
2,5 g Glucose

20 g Gelée royale, Gesamtmenge denaturiert
15 ml aqu. bidest

2.4.8. Aufzucht auf Diäten mit reduziertem Gelée royale- - Anteil

Insegesamt wurden 11 Diäten in je 2 Aufzuchtserien erprobt. Die Diäten waren als eine Verdünnungsreihe angesetzt, wobei der Gelée royale-Anteil um jeweils 1 % reduziert, der Wasseranteil dagegen um 1 % erhöht wurde.

Diät 16

2,5 g Fructose
2,5 g Glucose
19,6 g Gelée royale
15,4 ml aqu. bidest

Diät 17

2,5 g Fructose
2,5 g Glucose
19,2 g Gleée royale
15,8 ml aqu. bidest

Diät 18

2,5 g Fructose
2,5 g Glucose
18,8 g Gelée royale
16,2 ml aqu. bidest

Diät 19

2,5 g Fructose
2,5 g Glucose
18,4 g Gelée royale
16,6 ml aqu. bidest

Diät 20
2,5 g Fructose

2,5 g Glucose
18,0 g Gelée royale
17 ml aqu. bidest

Diät 21

2,5 g Fructose
2,5 g Glucose
17,6 g Gelée royale
17,8 ml aqu. bidest

Diät 22

2,5 g Fructose
2,5 g Glucose
17,2 g Gelée royale
18,2 ml aqu. bidest

Diät 23

2,5 g Fructose
2,5 g Glucose
16,8 g Gelée royale
18,6 ml aqu. bidest

Diät 24

2,5 g Fructose
2,5 g Glucose
16,4 g Gelée royale
19 ml aqu. bidest

Diät 25

2,5 g Fructose
2,5 g Glucose
16,0 g Gelée royale
19,4 ml aqu. bidest

Diät 26

2,5 g Fructose

2,5 g Glucose
14,0 g Gelée royale
21,4 ml aqu. bidest

2.4.9. Aufzucht auf einer Diät ohne Hefeextrakt-Zusatz

In 10 weiteren Aufzuchtserien wurde ab dem ersten Tag der in-vitro Haltung (2. Larventag) eine Diät verfüttert, die in ihrem Gelée royale-Gehalt der Kontrolldiät entsprach, jedoch nicht mit Hefe-Extrakt angereichert war.

Diät 27

2,5 g Glucose
2,5 g Fructose
20 g Gelée royale
15 ml aqu. bidest

2.5. Modifiziertes Aufzuchtverfahren zur Bestimmung der LD50

Für die Bestimmung der LD50 muß gewährleistet sein, daß das angebotene kontaminierte Futter von den Larven in einer vorgegebenen Zeit vollständig aufgenommen wird. Nur dann läßt sich aus der Insektizidkonzentration im Futter die pro Larve aufgenommene Dosis berechnen. Für Routine-Untersuchungen muß die Fütterung zudem so abgestimmt werden, daß nach Beendingung der Futteraufnahme im Rahmen eines Arbeitstages noch genügend Zeit für die Weiterversorgung der Larven verbleibt. Bei den hierzu durchgeführten Untersuchungen wurden den Larven 5 bzw. 20 µl der von Rembold beschriebenen Diät angeboten.

2.5.1. Die Aufzuchtgefäße

Da Fingerhüte zur Verfütterung der kleinen Diätmengen, die von den Larven in 8 bzw. 24 Stunden aufgenommen werden können, nicht geeignet sind, wurden zur Aufzucht nach mehreren Probeserien mit künstlichen Weiselnäpfen und Tüpfelplatten verschiedener Hersteller sog. Disposo

Trays mit konisch zulaufendem Boden (Fa. Linbro, Mekkenheim bei Bonn) verwendet.

2.5.2. Das Aufzuchtverfahren

In einem dieser Trays können pro Aufzuchtserie 96 Larven angesetzt werden. Um bei allen Serien von in etwa gleichaltrigen Larven ausgehen zu können, wurden die Larven zunächst nach ihrer Größe ausgesucht. Bei der Größenauswahl wurden die Larven nur dann für die Aufzucht übernommen, wenn der Umfang der gekrümmt auf der Umlarvnadel liegenden Larve dem eines Eichkreises von 3,5 mm entsprach. Zusätzlich wurde das Gewicht von 12 gleichgroßen Larven bestimmt. Diese Larven wurden, da sie meist durch die Manipulationen beim Wiegen verletzt worden waren, nicht in die Aufzucht einbezogen. Das ungefähre Alter der angesetzten Larven kann nach den Gewichts-Alterskorrelationen von Wang (1965) bestimmt werden. Die so synchronisierten Larven wurden für 24 Stunden ad libidum mit Futter versorgt. Anschließend wurde das Futter abgesaugt und das Gewicht von 12 Larven bestimmt. Auch diese Larven wurden nicht in die weitere Aufzucht einbezogen. Larven, die bis zu diesem Zeitpunkt in ihrer Entwicklung zurückgeblieben waren, wurden ebenfalls aus dem Versuch genommen. Den verbliebenen Larven wurden 5 µl bzw. 20 µl Diät angeboten. Diese Futtermenge wurde mit einer Dosierpipette verabreicht. Je nach Fortschreiten der Nahrungsaufnahme wurden die Larven in immer kürzeren Intervallen kontrolliert. Die Zeit bis zur vollständigen Aufnahme des Futters wurde gemessen. Anschließend wurde wieder Futter ad libidum angeboten.

2.6. TRACERVERSUCHE ZUR PASSAGE VON ^{14}C-CARBARYL UND ^{14}C-DIFLUBENZURON DURCH AMMENBIENEN

2.6.1. Die verwendeten Insektizid-Wirkstoffe

Cabaryl

Carbaryl (Strukturformel siehe Abb. 8) gehört neben weiteren insektiziden, aber auch fungiziden und herbi-

ziden Wirkstoffen (Aldikarb, Carbofuran, Mercaptodimetur, Methomyl, Promecarb, Propoxur u. a.) zur Verbindungsgruppe der Carbamate. Die insektizide Wirkung der Carbamate steht in engem Zusammenhang mit den Cholinesterase-hemmenden Eigenschaften zahlreicher Vertreter dieser Stoffklasse. Das Wirkungsspektrum der Carbamate ist breit und richtet sich in erster Linie gegen beißende, zum Teil auch gegen saugende Insekten. Bei den insektizid wirksamen Carbamaten handelt es sich durchweg um bienengefährliche Wirkstoffe. Als insektizider Wirkstoff ist Carbaryl neben der akariziden Komponente Tetradifon, Bestandteil des Kombinationspräparates KWP 61. In Weinbaugebieten Badens führte der Einsatz von KWP 61 gegen Spinnmilben und Traubenwickler zu erheblichen Bienenschäden (Buchner 1970, 1973; Stute 1975; Gnädinger 1976, 1977), bei denen neben den Flugbienen auch die Stockbienen und die Brut nachhaltig geschädigt wurden.

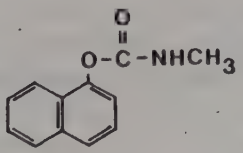

Abb. 8: Strukturformel von Carbaryl

Diflubenzuron

Diflubenzuron gehört zur Verbindungsgruppe der substituierten Phenylurea, deren insektizide Wirkung um 1970 bei Philips Duphar (Holland) entdeckt wurde. Der Wirkstoff ist Bestandteil des Insektizids DIMILIN 25 WP, das vor allem im Obstbau und im Forst gegen fressende Larvenstadien von Schadinsekten eingesetzt wird. Imagines können mit Diflubenzuron nicht bekämpft werden. Es wurde jedoch nachgewiesen, daß sowohl die Zahl der abgelegten Eier als auch die prozentuale Schlupfrate von Imagines von Leptinotarsa decemlineata und Epilachna

varivestis, die mit hoher Konzentration von DIMILIN behandelt wurden, stark herabgesetzt wurde (Grosscurt, 1978). Zwar entwickelt sich der Exbryo im Ei, jedoch geht durch die Störung der Chitinsythese die Stabilität verloren, die zum Durchbrechen der Eischale benötigt wird. Biochemische Untersuchungen haben gezeigt, daß Diflubenzuron den Aufbau von Chitin in der Endokutikula stört (Hajjal und Cassida, 1978). Es wurde festgestellt, daß in der Biosynthesekette von Glucose über Uridindiphosphat-N-acetylglucosamin, Diflubenzuron mit der Polykondensation zu Chitin interferiert, wahrscheinlich durch vollständige Blockierung des Enzyms Chitinsynthetase. Andere Untersuchungen ergaben, daß es sich um eine Erhöhung der Chitinase handelt, also um eine Beschleunigung des Abbaus von Chitin (Ishaaya und Cassida, 1974). Nicht auszuschließen ist, daß beide Prozesse: Aufbau und Abbau von Chitin beeinflußt werden, wobei der hemmende Einfluß auf den Aufbau überwiegt oder primär ist. Über durch DIMILIN 25 WP verursachte Brutschäden in Bienenvölkern liegen verschiedene Berichte vor (Egger, 1977; Gijswijt, 1978).

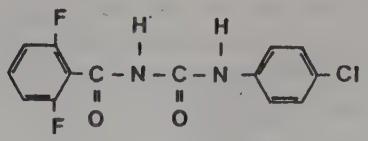

Abb. 9: Strukturformel von Diflubenzuron

2.6.2. Die Versuchsbienen

Für die Untersuchungen wurden altersmarkierte Arbeiterinnen, also Ammenbienen mit gut entwickelten Hypopharynxdrüsen, verwendet (Liesche, 1981). Die Bienen wurden den Völkern jeweils kurz vor den Versuchen entnommen.

2.6.3. Dosierung und Applikation der Wirkstoffe

Carbaryl

Der in Benzol gelöste Wirkstoff (50 /uCi ind 210 /ul Benzol,

spez. Akt 59.5 mCi/mmol) wurde von der Fa. Amersham-Buchler bezogen. 10 µl dieser Stammlösung wurden zu 20 ml einer 2 molaren Glucose-Fructoselösung gegeben, der zur besseren Aufnahme durch die Bienen geringe Mengen Honig (3,6 g) beigemengt wurden. Nach einer Hungerperiode von 2 Stunden wurden die Bienen mit je 25 µl dieser Futterlösung von Hand aus einer Micropipette gefüttert. Bei der Fütterung nahm jede Biene im Mittel 10 ng Carbaryl auf.Die mittlere gemessene Aktivität der Futterdosis lag bei 9500 dpm. Eine toxische Wirkung auf die Bienen konnte bei dieser Dosierung nicht beobachtet werden. Die kontaminierten Bienen überlebten in Einzelhaltung bis zu 6 Tagen.

Diflubenzuron

4,73 mg des kristallinen Wirkstoffes (Geschenk der Fa. Philips Duphar; Akt. O.157 mCi, spez. Akt. 33,2 mCi/g, Molek. Gew. 310) wurden in 1 000 µl Aceton gelöst. Aus dieser Stammlösung wurde mit einer 2 molaren Glucose-Fructoselösung, der 3,6 g Honig zugesetzt waren, ein 1 % Wirkstoffgemisch angesetzt. Pro Biene wurden 25 µl dieser Suspension verfüttert. Dabei nahmen die Bienen im Mittel 1,2 µg des Wirkstoffes auf. Die durchschnittliche Aktivität der Futterdosis lag bei 55000 dpm. Wie bei dem larviziden Wirkstoff zu erwarten war, traten bei den Bienen keine toxischen Effekte auf. Während der Inkubationszeit erhielten nur die Bienen, die für Langzeitversuche (24 h, 48 h) vorgesehen waren, eine 2 molare Zuckerlösung als Futter.

2.6.4. Präparation der Versuchstiere

In den Kurzzeitversuchen wurden die Bienen nach Inkubationszeiten von 1/4 h, 1/2 h, 1 h, 2 h, 4 h und 6 h für die Langzeitversuche nach 24 h bzw. 48 h mit CO_2 betäubt und in wachsgefüllten Glasschälchen präpariert. Mit einem Schnitt durch 2 der Abdominaltergite wurde das Abdomen geöffnet und mit einer geeichten Micropipette 5 µl Haemolymphe entnommen. Nachdem die Tergite vollständig entfernt

waren, konnten die Honigblase, der Mittel- und Dünndarm sowie das Rektum und die Malpighischen Gefäße herauspräpariert werden. Zur Präparation der Drüsen wurden Kopf und Thorax voneinander getrennt und in das Wachs der Präparierschale eingebettet. Nachdem das Pronotum mit dem ersten Beinpaar entfernt war, ließ sich die Prothorax-Drüse zwischen der Flugmuskulatur herausziehen. Die Kopfkapsel wurde frontal geöffnet und die Hypopharynx-Drüse, die Mandibel-Drüsen und die Hinterkopf-Drüsen herauspräpariert. Vor jedem Präparationsschritt wurden die Präparierbestecke in Dekontaminationsflüssigkeit gereinigt. Pro Inkubationszeit wurden 2 Bienen präpariert. Insgesamt wurden pro Biene 500 µl Insektenringer (100 mMol NaCl, 10 mMol KCl 1,7 mMol $CaCl_2$; pH = 7,0) zur Präparation und zur Spülung der Gewebeproben verwendet. Die Gewebeproben, der Restkörper, die Haemolymphe und der Präparations-Ringer wurden für 24 h in je 300 µl Gewebelöser (Didodecyldimethyl ammoniumhydroxid; Fa. Serva) aufbewahrt. Anschließend wurde jede Probe mit 10 ml Szintillations--Flüssigkeit (Unisolve I, Nuclear England) versetzt. Die Radioaktivität wurde in einem Flüssigkeits-Szintillations-Zähler (Pacard Tricarb mit internem Standard) bei einer Messdauer von einer Minute ermittelt. In Vergleichsmessungen wurde der Quench der einzelenen Gewebe bestimmt. Die Messdaten wurden gegen den Proben-spezifischen Quench und den Background korrigiert. Für die Auswertung wurden die Einzelwerte der beiden Versuchsreihen gemittelt. Da die Haemolymph-Probe, die etwa nur 1/4 des Gesamtvolumens ausmacht, stets nur eine geringe Markierung aufwies, muß angenommen werden, daß ein Großteil des in der Haemolymphe vorhandenen Carbaryls erst durch die Präparation im Ringer bzw. durch die Spülung der Gewebe gewonnen werden konnte. Bei der Auswertung der Ergebnisse wurden diese Fraktionen daher zusammengefaßt.

3. Ergebnisse

3.1. Prüfverfahren: Insektizidfütterung an Völker in Flugzelten

3.1.1. Sammelaktivität und Verhalten der Bienen in den Flugzelten

Nach ersten Orientierungsflügen wurden die Futterstellen von den Bienen gefunden und auch weiterhin angeflogen. Das angebotene Honig-Zuckerwasser wurde stets gut eingetragen (2oo-3oo ml / Tag). Dagegen wurde von der täglichen Pollenration oftmals nur wenig mehr als die Hälfte (1oo-12o g) bis zum Abend eingesammelt. Demzufolge waren auch alle Waben der Völker gut mit Zuckerwasser-Vorräten gefüllt, Pollen fand sich dagegen nur verstreut auf den ersten 3 Waben hinter dem Flugloch. Auf den Brutwaben waren nur vereinzelt Zellen mit Pollen gefüllt.

Die Sammelaktivität muß im Zusammenhang mit dem Flugverhalten der Bienen in den Flugzelten gesehen werden. Dabei fällt auf, daß stets mehr Bienen außerhalb des Stockes sind, als sich am Eintragen des Futters beteiligen. Der überwiegende Teil dieser Bienen fliegt unablässig gegen die Wände und die Decke der Flugzelte, wobei in beiden Zelten, unabhängig von der Tageszeit die westliche Seitenwand bevorzugt wurde. Stellen, an denen sich die Bienen in den Flugzelten bevorzugt ansammelten (trapping centers) und zu Trauben verklammert sitzen blieben, fanden sich an allen Oberkanten der Flugkäfige. Besonders stark waren sie in der NW Ecke der Zelte ausgeprägt. Gelegentlich wachsen diese Bienenansammlungen während des Tages bis auf Stärken von 5oo-1ooo Individuen. Erst in den Abendstunden lösen sie sich allmäh-

lich auf, jedoch kehren nicht alle Bienen in den Stock zurück.

3.1.2. Entwicklung der Brutnester in den Flugzelt-Völkern

Zu Beginn der Flugzelthaltung umfaßte das Brutnest des Volkes 1 5 Waben. Die photographische Aufzeichnung des Brutbestandes zeigte, daß das Volk zu diesem Zeitpunkt ca. 77oo verdeckelte Brutzellen hatte. Bei der Kontrolle nach 7 Tagen war der überwiegende Anteil der anfangs vorhandenen verdeckelten Brut geschlüpft. Neue, jedoch weitaus kleinere Brutareale waren angelegt worden. Am letzten (21.) Tag der Flugzelthaltung wurden von diesem Volk nurmehr 4 Waben mit insgesamt ca 175o verdeckelten Zellen bebrütet. Diese verdeckelte Brut muß demnach während der 21 Tage der Flugzelthaltung aufgezogen worden sein. Bezogen auf die unter Freilandbedingungen im gleichen Zeitraum bis mindestens zur Verdeckelung aufgezogene Brut bedeutet dies eine Einschränkung der Aufzuchtrate um 77,3 %. Diese drastische Reduktion der Brutaufzucht spiegelt sich auch in der durch Kannibalismus verursachten Ausfallrate wider, die für 2, 3 und 4-tägige Larven bei 48,4% und damit extrem hoch liegt.

Die Bienen des Volkes 2 bebrüteten während der gesamten Zeit der Flugzelthaltung 6 Waben. Anfangs befanden sich ca. 8ooo verdeckelte Zellen im Brutnest. Das Volk zog während der 21 Tage im Flugkäfig 43oo Larven bis mindestens zur Verdeckelung der Zellen auf. Gemessen an der Brutaufzuchtleistung unter Freilandbedingungen bedeutet dies eine Reduktion der Aufzuchtrate um 46 %. Wie auch im Volk 1 ist die Einschränkung der Brutaufzucht zu etwa 3/4 durch Kannibalismus bedingt, dem im Volk 2 29 % der 2-4-tägigen Larven zum Opfer fielen.

Als weitere Ursache für den starken Brutrückgang in beiden Völkern kommt neben dem Kannibalismus an frühen Entwicklungsstadien (Eier und Junglarven) auch eine Verringerung der Eiablagerate der Königin in Frage. Nähere Untersuchungen hierzu wurden nicht durchgeführt.
Das freifliegende Kontrollvolk legte während der gesamten Beobachtungszeit große Brutflächen an. Die Bienen besetzten zu Ende des Versuchs alle 1o Waben, von denen 8 bebrütet wurden. Dem Volk mußte nach Versuchsende eine weitere Zarge aufgesetzt werden, um es am Schwärmen zu hindern. Die Kannibalismusrate wurde für dieses Volk nicht näher bestimmt, sie lag jedoch wie die Fehlstellen im Brutbereich zeigten, nicht über 1o %.

3.2. Prüfverfahren: Insektizidverfütterung an brutpflegende Ammenbienen

Bei der Auswertung der Versuche mußte festgestellt werden, daß der Käfig, unter dem die Ammenbienen zu den Larven gesperrt wurden, in allen Versuchen von den Bienen untergraben worden war, so daß die Ammen entkommen konnten. Die Larven unter den Käfigen wurden nicht oder nur sehr schlecht gepflegt. Dies kann aus einem für hungernde Larven typischen Verhalten geschlossen werden: Die überlebenden Larven waren vom Boden ihrer Zellen bis an den Rand herausgekrochen, andere waren aus ihren Zellen gefallen und lagen am Boden des Gitters. Die überwiegende Anzahl der Larven war von den Bienen gefressen worden. In die leeren Zellen wurde z.T. Honig aus den umliegenden Zellen eingetragen.

3.3. Prüfverfahren: Direkte Applikation des Insektizids an Bienenlarven auf Waben freifliegender Völker.

Larventest in Beobachtungsvölkern

Bei den in den Beobachtungsvölkern durchgeführten Untersuchungen zur Applikation und Darreichungsform des Insektizids, hat sich gezeigt, daß bei Verfütterung der Testlösung ohne Insektizid-Zusatz nur eine sehr geringe Mortalität von 8 % hervorgerufen wird. Diese geringe Brutausfallrate gibt einen ersten Hinweis darauf, daß durch die Verwendung des Testfutters als Lösungsmittel für die Prüfsubstanz wesentlich geringere Ausfallraten verursacht werden, als dies bei Verwendung von Wasser der Fall ist. Dieser Befund wird durch die in größeren Serien durchgeführten Kontrollen in den Untersuchungen an Magazinvölkern bestätigt.
Zwei weitere, für die Anwendung des Testverfahrens wesentliche Beobachtungen konnten bei der Applikation hoher DIMILIN-Konzentrationen an die Larven in den Beobachtungsbeuten gemacht werden:

1. Bei der Applikation von 212 ppm DIMILIN an 5-tägige Larven wurde der erwartete Brutausfall von 1oo % zunächst nicht erreicht. Stattdessen wurden bei der Kontrolle einen Tag nach dem Verdeckeln der Zellen Mortalitätsraten ermittelt, die im Durchschnitt bei 16,2 % lagen. Bei der Kontrolle nach 4 Tagen wurde ein Anstieg der mittleren Brutausfallrate auf 7o,5 % verzeichnet. Wie sich herausstellte, befanden sich in allen verdeckelten Zellen der Beobachtungsflächen tote Vorpuppen bzw. frühe Puppenstadien. Sie waren alle braun verfärbt und platzten bei Berührung leicht auf. Die auslaufende Flüssigkeit wurde von den Stockbienen sofort aufgeleckt.

Somit ist festzustellen, daß tote Vorpuppen bzw. Puppen oft über längere Zeit in den verdeckelten Zellen verbleiben, ohne von den Bienen ausgefressen zu werden.

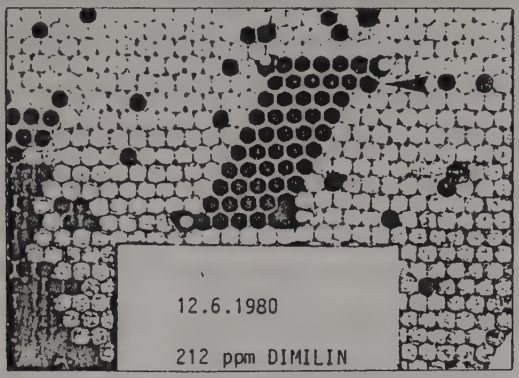

Abb. 1o a) Ausschnitt einer Brutwabe mit durch Stecknadeln (weiße Punkte) abgesteckter Versuchsfläche von 5o Zellen, 4 Tage nach Applikation von 1o µl Gelée royale-Zucker-Gemisch mit DIMILIN-Zusatz. Die hohe Dosis (212 ppm) bewirkte eine Mortalität von 1oo %. Da die Versuchsfläche als Feld leerer Zellen scharf begrenzt ist, kann davon ausgegangen werden, daß das applizierte Testgemisch von den Stockbienen nicht an Larven in den umliegenden Zellen vertragen wurde. (Die Zelle rechts oben ➤ war schon zu Versuchsbeginn leer).

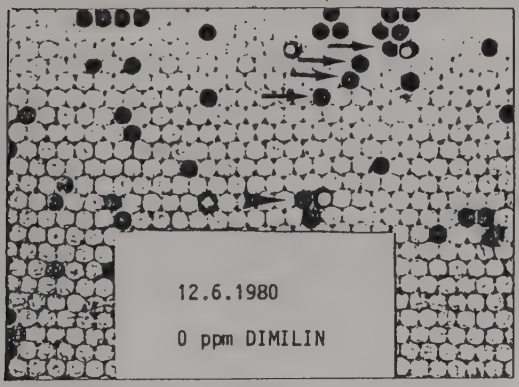

Abb. 1o b) Paralleler Kontroll-Versuch auf der Rückseite derselben Wabe, bei dem in der abgesteckten Fläche von 5o Zellen 49 mit Larven belegt waren. Die Applikation von 1o µl Testgemisch ohne DIMILIN-Zusatz ergab bis zum Verdeckeln einen Ausfall von 4 Larven→ = 8 % (Die Zelle rechts unten ➤ war bereits zu Versuchsbeginn leer).

2. Bei Verfütterung von 212 ppm DIMILIN an 2-3 Tage alte Larven starben diese bereits während oder kurz nach der nächsten Häutung ab, so daß keine der Zellen verdeckelt wurde. Wie die scharfe Begrenzung der abgesteckten Versuchsfelder zeigt (Abb. 1o a), bleiben die Effekte des Wirkstoffs auf die einzelne Larve beschränkt, der individuell eine best. Dosis verabreicht wurde. Somit kann ausgeschlossen werden, daß das Testgemisch von den Ammen in Brutzellen außerhalb des Testareals umgetragen wird. Bei der hohen Dosierung hätte es auch in diesen Zellen zu Brutausfällen kommen müssen. In den umliegenden Zellen entwickelte sich die Brut jedoch normal weiter und wurde verdeckelt. Auf der Rückseite derselben Wabe wurde eine Kontrollgruppe mit Testgemisch ohne DIMILIN-Zusatz gefüttert. Dieses Testareal hebt sich nach dem Verdeckeln kaum von der umgebenden Brutfläche ab, die ebenfalls einige Lücken aufweist (Abb. 1o b). In diesem Kontrollbereich fielen von 5o Larven 4 aus, was einer Mortalität von 8 % entspricht.

Larventest in Magazin-Völkern

Wie sich in 19 Kontrollserien, in denen insgesamt rund 95o unbehandelte Larven kontrolliert wurden, zeigte, lag die spontane Brutausfallrate der Testvölker mit geringer Streuung bei durchschnittlich 7 % (Tab. 1). In Kontrollversuchen mit Testgemisch ohne DIMILIN-Zusatz wurde eine etwas höhere Mortalität ermittelt. Der auf ca. 8oo beobachteten Larven basierende Mittelwert von 16 % enthält offensichtlich 9 % versuchsbedingten Brutausfall und liegt um 8 % höher als die in den Beobachtungsbeuten gefundene Ausfallrate.

Die um den Mittelwert der O-Kontrollen (16 %) verringerten durchschnittlichen Brutausfallraten der 6 Testserien mit verschiedenen DIMILIN-Konzentrationen wurden zur graphischen Ermittlung der LC 50 verwendet (Abb. 11).

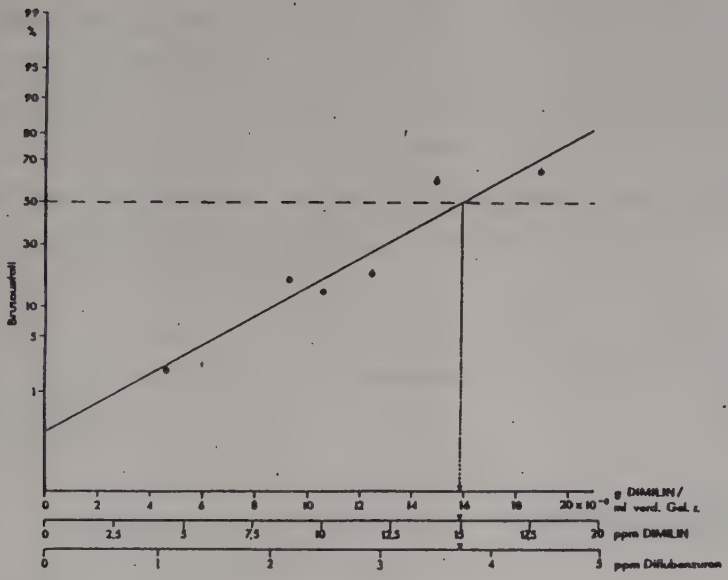

Abb. 11: Graphische Bestimmung der mittleren LC_{50} von DIMILIN (15,9 ppm) bzw. Diflubenzuron (3,7 ppm) für Bienen-Larven der Stadien L2, L3 und L4. Die Punkte repräsentieren die korrigierten durchschnittlichen Mortalitätsraten (Mittelwerte der Testserien abzüglich des Durchschnittswertes der O-Kontrollen: vgl. Tab. 1). Abszissen: Konzentration des Testgemisches bzw. Gehalte an Formulierung oder Wirkstoff. Ordinate: Häufigkeiten des Brutausfalls, Teilung nach dem Gauß'schen Integral.

Diese kann als 15,9 ppm DIMILIN 25 WP abgelesen werden, was bei einem Wirkstoffgehalt von 25 % einer LC 50 von 3,7 ppm für Diflubenzuron Reinsubstanz entspricht. Dieser Wert ist als mittlere Toxizität für die Honigbienen-Larvenstadien

ppm DIMILIN in verdünntem Gelée royale	Anzahl der Versuchsserien = n, mit je ca.50 Larven	Brutausfall in % $\bar{x}$	s
17,9	5	81	6,2
14,2	7	76	6,3
11,8	8	45	3,4
10,0	5	30	6,9
8,9	5	34	4,6
4,4	7	18	2,5
0,0	16	16	2,7
unbehandelt	19	7	1,6

Tab. 1: Brutausfall nach einmaliger individueller Applikation von DIMILIN 25 WP an Bienenlarven der Stadien L2, L3 und L4. Ermittelt wurde die Mortalität bis nach Verdeckeln der Brutzellen.

L2, L3 und L4 anzusehen, da zum Applikationszeitpunkt nur diese 3 der insgesamt 5 fressenden Larvenstadien in den Testgruppen vertreten waren.

Wie hier am Beispiel einer LC 50 Bestimmung von DIMILIN gezeigt wurde, läßt sich das Testverfahren mit direkter Applikation des Insektizids auch in Magazin-Völkern durchführen. Zwar treten hierbei im Vergleich zur Durchführung in Beobachtungsbeuten höhere Mortalitäten in den Kontrollen auf, jedoch ist der Unterschied gering. Von besonerer Bedeutung ist, daß es durch die Verwendung des Gelée royale-haltigen Testgemisches gelingt, die Brutausfallrate in den Kontrollen, die bei Verwendung von Wasser bei 34 % liegt (Wittmann,1978), um mehr als die Hälfte zu verringern. Damit ist es möglich, auch bei niedriger Dosierung insektizidbedingte Mortalitäten von versuchsbedingten Ausfällen zu unterscheiden.

3.4. Prüfverfahren: Direkte Applikation des Insektizids an in vitro-aufgezogene Bienenlarven

Trotz verschiedener Sicherheitsvorkehrungen wie Wärmeisolierung der Larven bei der Fütterung, regelmäßige Desinfektion der Brutschränke, der Fingerhutgestelle und der zur Abdeckung der Aufzuchtgefäße verwendeten Glasplatten sowie einer ständigen Kontrolle der Temperatur und Luftfeuchtigkeit in den Brutschränken, waren die Aufzuchterfolge bei der in vitro-Haltung von Bienenlarven z.T. starken Schwankungen unterworfen. In Aufzuchtserien, in denen größere Mortalitäten (bis zu 80 %) auftraten, setzten diese erst am 4. bzw. 5. Tag nach dem Umlarven ein. Die größten Ausfallraten, die oftmals zum Verlust einer ganzen Versuchsserie führten,

waren stets bei den Streckmaden, kurz vor der Verpuppung zu verzeichnen. Dies gilt sowohl für die Aufzuchtserien mit Testdiäten, als auch für Aufzuchten mit der Kontrolldiät.

Die mit der Kontrolldiät erzielten Aufzuchtraten lagen zwischen 15 und 82 %; im Mittel konnten 39,1 % der Larven bis zum Imaginalstadium aufgezogen werden. Von den geschlüpften Bienen waren 18,4 % Königinnen und 2,9 % Königinnen-ähnliche Intermediärstadien. Zwischenformen der Gruppe C entstanden zu 3,7 %, Arbeiterinnen-ähnliche Formen (D) zu 10,9 %. Der überwiegende Anteil an der Gesamtaufzuchtrate waren reine Arbeiterinnen (64 %). Die Berechnung dieser Daten beruht auf 8 Kontrollserien mit je 60 Larven. Weitere Kontrollen konnten nicht berücksichtigt werden, da keine der Larven das Imaginalstadium erreichte.

3.4.1. Aufzucht auf Altlarvendiäten mit Honig-Pollen-Zusatz

Diät 1

Von den 30 mit dieser Diät aufgezogenen Larven erreichten nur 2 (6,6 %) das Adultstadium. Beide Imagines waren reine Arbeiterinnen. Im Wiederholungsversuch entwickelten sich 18 von 30 Larven bis zur Streckmade, das Puppenstadium erreichten sie jedoch nicht.

Diät 2

In der ersten Aufzuchtserie mit dieser Diät konnten 10 % der Larven zu Imagines aufgezogen werden. Die 3 geschlüpften Bienen waren ebenfalls Arbeiterinnen. In der zweiten Serie starben sämtliche Larven vor dem Puppenstadium ab.

Diät 3

Auch mit dieser Diät entwickelten sich nur 2 Larven zu Imagines. Beide waren Arbeiterinnen. In der Wiederholungsserie erreichte keine der 60 Larven das Puppenstadium.

Diät 4

Mit dieser Diät konnten von 30 Larven 8 (26,6 %) zu Imagines aufgezogen werden. 5 der Bienen (62,5 %) waren Arbeiterinnen, je eine Biene wurde als Königin bzw. als Intermediärform B und C klassifiziert. Bei der mit 60 Larven angesetzten Wiederholungsserie konnte keine Imago aufgezogen werden.

Diät 5

Auf dieser Diät, deren Gelée royale-Gehalt nurmehr 15 g (37,5 % des Gesamtgewichts) enthielt, entwickelten sich 50 % der 30 angesetzten Larven zu Imagines. 4 der Bienen (26,5 %) waren Königinnen, weitere 4 Arbeiterinnen-ähnliche Zwischenformen (D) und 7 (47 %) reine Arbeiterinnen. Diese Aufzuchtrate wurde in den 6 Wiederholungsserien nicht mehr erreicht. Nur in einem Fall gelang es, eine Imago aufzuziehen, die die Kastenmerkmale einer Königin besaß.

Diät 6, 7, 8

Mit keiner dieser Diäten gelang es, Imagines aufzuziehen. Die Ursache hierfür ist vermutlich der geringe Gelée royale-Gehalt der Diäten.

Diät 9, 10, 11

Auch mit diesen Diäten, die in ihrer Zusammensetzung den Diäten 3, 4 und 5 entsprachen, jedoch mit einer Vitaminlösung angereichert waren, konnten keine Imagines aufgezogen werden.

3.4.2. Larvenaufzucht mit Zwischenfütterung während der kritischen Phase.

Diät 12 und 13

Diese während der kritischen Phase (4. Tag) angebotenen Diäten wurden von den Larven gut aufgenommen. Im Verlauf des 4. Tages starben in insgesamt 4 Serien lediglich 3 Larven ab. Erst nachdem wie die Junglarvendiät angeboten wurde, kam es kurz vor der Verpuppung zu starken Brutausfällen. Lediglich eine Larve entwickelte sich bis zur Puppe (Rotaugenstadium).

3.4.3. Larvenaufzucht mit hitzebehandelten Gelée royale-Diäten

Diät 14

Auffallend hohe Aufzuchtraten (88,3 bzw. 90 %) konnten mit dieser Diät, deren Gelée royale-Gehalt zur Hälfte (1o g = 5o%) denaturiert war, erzielt werden. Bemerkenswert ist der hohe Anteil von Arbeiterinnen (73,6 % bzw. 75,9 %) an der Gesamtaufzucht. Arbeiterinnen-ähnliche Intermediärstadien entstanden zu 7,5 % bzw. 13 %. Von den insgesamt 53 bzw. 55 geschlüpften Imagines waren nur 5 (9,5 %) bzw. 2 (3,7 %) Königinnen. Die übrigen Bienen waren Intermediärformen der Gruppen B und C.

Diät 15

Mit dieser Diät, deren gesamter Gelée royale-Anteil denaturiert war, konnten zwar insgesamt weniger Imagines aufgezogen werden (53,3 % bzw. 15 %), jedoch waren die schlüpfenden Bienen zu 9o,1 %, in der Wiederholungsserie zu 1oo %, Arbeiterinnen.

3.4.4. Larvenaufzucht auf Diäten mit reduziertem Gelée royale-Gehalt

Diäten 16 - 26

Die mit den Diäten 16 - 26 in jeweils 2 Zuchtansätzen erzielten Überlebensraten sind, wie auch die Angaben zur Kastendetermination, in Tab. 2 zusammengefaßt.

In der gesamten Versuchsserie konnten bei erheblichen Schwankungen (s=22,6) von 1320 angesetzten Larven im Mittel 48,1 % zu Imagines aufgezogen werden. Wie die Regressionsanalyse der mittleren Überlebensraten aller Aufzuchtserien ergibt, hat der Gelée royale-Gehalt der Diäten einen unverkennbaren Einfluß auf den mit den einzelnen Diäten erzielten Aufzuchterfolg: während mit der Diät 16 bei einem Gelée royale-Gehalt von 19,6 g im Durchschnitt 72,5 % der Larven bis zum Adulttier aufgezogen werden konnten, waren es bei Verfütterung der Diät 26 (14 g Gelée royale) nurmehr 22,5 % der Larven, die das Imaginalstadium erreichten (Abb. 12).

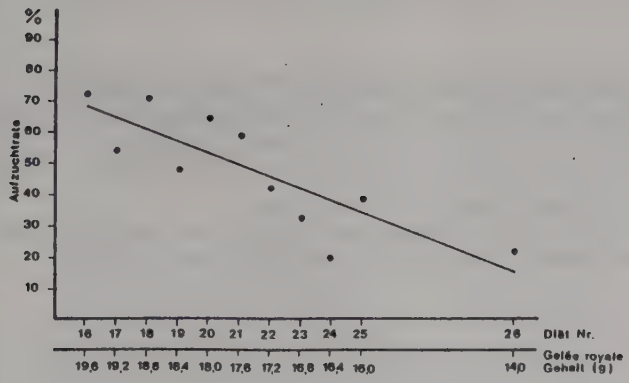

Abb. 12: Abhängigkeit der Überlebensrate vom Gelée royale-Gehalt der Diäten 16-26. Abszissen: Nummern der Diäten, Gelée royale-Gehalt der Diäten in g/40g-Diät.

Vergleicht man den Prozentsatz, mit dem die Arbeiterinnen-Kaste an der Gesamtaufzucht-Rate der einzelnen Diäten vertreten ist, mit dem Anteil der Arbeiterinnen, die bei Verfütterung der Kontroll-Diät entstehen, so zeigt sich, daß es mit allen Diäten gelungen ist, im Mittel mehr Arbeiterinnen aufzuziehen, als mit der Kontroll-Diät (Abb. 13).

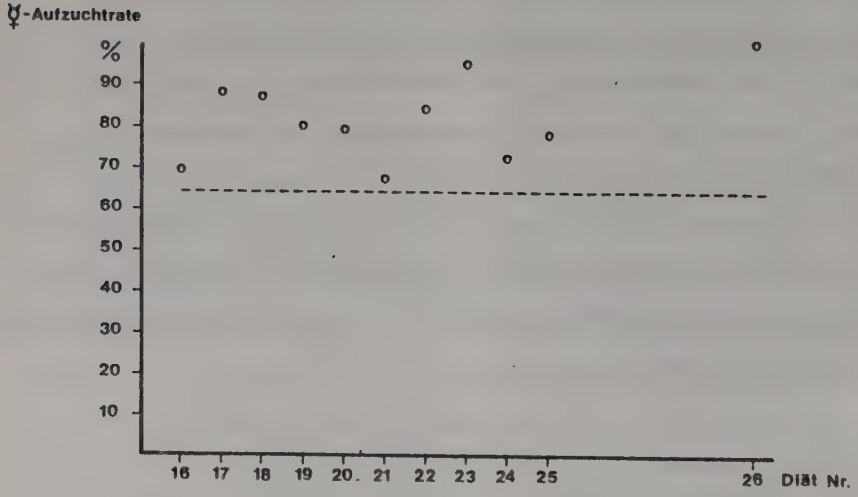

Abb. 13: Mittelwerte der Aufzuchtraten von Arbeiterinnen bei Verfütterung von Diäten mit reduziertem Gelée royale-Gehalt. Mit jeder der Diäten konnten mehr Arbeiterinnen aufgezogen werden als mit der Kontrolldiät.
Ordinate: Aufzuchtrate von Arbeiterinnen in % der Gesamtaufzuchtrate
Abszisse: Nummern der Diäten
Gestrichelte Linie: Mittelwert der Arbeiterinnen-Aufzuchtraten mit der Kontrolldiät.

Diät Nr	Gelée royale Gehalt g	No Larven	n	Imagines %	Kastenanteile in % der Aufzuchtrate A	B	C	D	E
16	19,6	60	2	72,5	8,8	3,2	4,2	14,2	69,6
17	19,2	60	2	54,9	4,5	4,5	0	2,5	88,5
18	18,8	60	2	71,6	0	4,7	1,4	6,4	87,5
19	18,4	60	2	48,3	7,6	0	2,2	9,9	80,3
20	18,0	60	2	65,0	2,5	3,9	5,2	9,0	79,4
21	17,6	60	2	59,3	11,1	4,7	4,7	12,1	67,4
22	17,2	60	2	42,5	0	4,0	7,9	4,0	84,1
23	16,8	60	2	33,3	0	2,3	0	2,3	95,4
24	16,4	60	2	20,0	2,8	5,5	8,4	11,1	72,2
25	16,0	60	2	39,2	0	10,0	6,7	4,9	78,4
26	14,0	60	2	22,5	0	0	0	0	100
Kontrolle									
--	20	60	8	39,1	18,4	2,9	3,7	10,9	64,1

Tab.2: Mittelwerte der Aufzuchtraten (%) und der Kastenanteile in % der Aufzuchtrate bei der Verfütterung der Diäten 16-26. Bis zum Beginn des 4. Tages der Entwicklung erhielten die Larven die Hefeextrakt-haltige Kontrolldiät. Anschließend wurden die Testdiäten angeboten. Diese Diäten enthielten keinen Hefeextrakt, ihr Gelée-royale-Anteil war gegenüber der Kontrolldiät um 1%-15% reduziert. Mit jeder dieser Diäten ist es gelungen, mehr Arbeiterinnen aufzuziehen als mit der Kontrolldiät. Ab einem Geléeroyale- Gehalt von 17,2 g/40g entstanden keine oder nur wenige Königinnen.

3.4.5. Larvenaufzucht auf einer Diät ohne Hefezusatz

Mit dieser Diät, die in ihrer Zusammensetzung der Kontroll-Diät entspricht, jedoch keinen Hefeextrakt enthält, wurden in 10 Serien insgesamt 600 Larven vom ersten Tag der in vitro-Haltung an gefüttert. Von diesen Larven entwickelten sich 282 (47 %) zu Imagines. Im Gegensatz zur Kontrolle, in der der Königinnen-Anteil bei 18,5 % lag, waren nur 0,3 % der mit dieser Diät aufgezogenen Bienen reine Königinnen)Tab. 3). Intermediärformen entstanden insgesamt nur zu 6,7 % im Gegensatz zu 17,5 % in der Kontrolle. Bemerkenswert ist der hohe Anteil Arbeiterinnen, der mit 93 % um knapp 30 % höher liegt als bei Verfütterung der hefehaltigen Diät (Abb. 14).

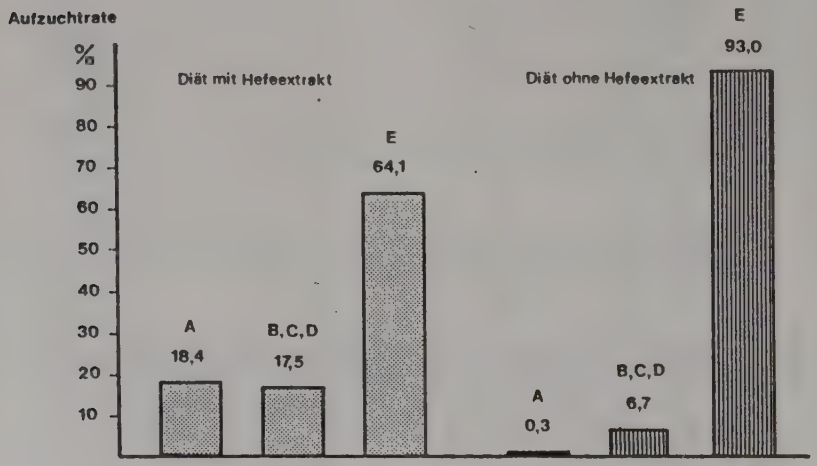

Abb. 14: Aufzuchtraten von Königinnen (A), Intercasts (B,C,D) und Arbeiterinnen (E), die mit der hefeextrakthaltigen Kontrolldiät und mit der nicht mit essentiellen Nährstoffen angereicherten Diät 27 erzielt wurden. Beide Diäten hatten den gleichen Gelée royale-Gehalt. Es zeigt sich ein deutlicher Einfluß des Nährstoffgehalts auf die Kastendetermination.

Diäten	No Larven	n	Imagines %	Kastenanteile in % der Aufzuchtrate				
				A	B	C	D	E
Kontroll-Diät	60	8	39,1	18,4	2,9	3,7	10,9	64,1
Test-Diät	60	10	47,0	0,3	1,6	0,6	4,5	93,0

Tab.3: Aufzuchtrate (%) und Kastenanteile in % der Aufzuchtrate bei Verfütterung einer Hefeextrakt-haltigen Kontrolldiät und einer Testdiät ohne Hefezusatz. Die Diäten wurden jeweils ab dem 2.Tag der Larvalentwicklung (1.Tag der in-vitro- Haltung) angeboten. Die Aufzuchtserien wurden 8-10 mal wiederholt. Bei Verfütterung der nicht mit essentiellen Nährstoffen angereicherten Diät wurden knapp 30% mehr Arbeiterinnen und weniger Königinnen und Intercasts aufgezogen als mit der Kontrolldiät.

3.4.6. Modifiziertes Aufzuchtverfahren zur Bestimmung der LD 50

Für die in vitro-Aufzucht von Bienenlarven im Rahmen eines Testverfahrens zur Bestimmung der LD 50 von Pflanzenbehandlungsmitteln sind Disposo-trays vorzüglich geeignet. Der konisch zulaufende Boden dieser Gefäße ermöglicht es, den Larven auch geringe Mengen kontaminierten Futters so anzubieten, daß es ohne Schwierigkeiten aufgenommen werden kann. Da die Gefäße durchsichtig sind, kann auch bei größeren Larven, die einen Großteil des Bodens bedecken, leicht festgestellt werden, ob die angebotene Futtermenge vollständig aufgenommen wurde.

Wie sich herausstellte, benötigen 3-tägige Larven (60-80 mg Körpergewicht) zur Aufnahme von 5 µl Futterlösung zwischen 5 und 10 Stunden. Die individuell verschiedenen Fraßzeiten werden vor allem dadurch bedingt, ob eine Häutung in die Fütterungszeit fällt und wie lange eine Larve für die Häutung braucht.

Zur Aufnahme von 20 µl Futterlösung benötigen 3-tägige Larven ca. 24 Stunden. Legt man den Zeitpunkt der Fütterung mit kontaminierter Diät in die Mittagsstunden, so ist am nächsten Tag noch genügend Zeit vorhanden, um Larven, die die Futteraufnahme früher bzw. später beenden, weiter zu versorgen. Soll die LD 50 für jüngere oder ältere Larven bestimmt werden, so muß die Futtermenge nach Bedarf geändert werden. Hierzu sind im Einzelfall weitere Untersuchungen notwendig. Das hier für 3-tägige Larven ermittelte Verhältnis von Futtermenge und Fraßzeit stellt somit einen Richtwert dar, der je nach Fragestellung der Insektizid-Prüfung variiert werden kann.

3.5. Passage von ^{14}C-Carbaryl und ^{14}C-Diflubenzuron durch Ammenbienen.

3.5.1. Carbaryl

In Zucker-Honigwasser gelöstes Carbaryl gelangt schon kurz nach der Verfütterung an Bienen durch Diffusion aus der Honigblase in die Haemolymphe (Conner et al. 1978), wird aber auch wie hier gezeigt werden konnte, rel. rasch in den Mitteldarm aufgenommen (Tab. 4). Bereits nach 15 min. können dort 17 % der wiedergefundenen Gesamtaktivität nachgewiesen werden. Ein Teil des Carbaryls wird im Mitteldarm resorbiert und gelangt in die Haemolymphe. Dort kommt es innerhalb der ersten 15 min. zu einem starken Carbaryl-Stoß, jedoch zu keiner weiteren Anreicherung. Vielmehr nimmt der Carbarylgehalt während der ersten 2 Stunden langsam, dann jedoch rasch ab. Hierfür kommen mehrere Ursachen in Frage: zum einen nehmen, wie die starke Markierung der Restkörper-Fraktion zeigt, viele Gewebe Carbaryl aus der Haemolymphe auf. Zum anderen setzt die Exkretion über die Malpighischen Gefäße sofort ein. Außerdem läßt die Diffusion aus der Honigblase nach, da ihre Füllung nach 2 Stunden nahezu vollständig in den Mitteldarm übergegangen ist. Nach 6 Stunden ist auch der größte Teil der aufgenommenen Nahrung aus dem Mitteldarm über den Dünndarm in das Rektum übergegangen, sodaß nurmehr geringe Mengen Carbaryl resobiert werden können. Das resorbierte und von den Geweben aufgenommene Carbaryl wird durch Dekarboamylierung (Cocks, 1975) abgebaut, wobei $^{14}Co_2$ freigesetzt wird. Dies erklärt die insbesondere bei langen Inkubationszeiten rasch abnehmende Markierung der Restkörper-Fraktion.

Wie sich zeigt, wird nur ein geringer Teil des oral aufgenommenen Carbaryls resorbiert. Schon nach 30 min. läßt sich

eine hohe Markierung in der Kotblase nachweisen, wo sich das nicht resorbierte wie auch das über die Malpighischen Gefäße wieder ausgeschiedene Carbaryl anreichert. 24 Stunden nach der Fütterung sind 94 % der insgesamt wiedergefundenen Aktivität im Rektum nachzuweisen.
Von besonderer Bedeutung ist, daß in keiner der an der Sekretion von Futtersaft für die Larven beteiligten Drüsen Carbaryl angereichert wird. Nach 48 Stunden liegt die Aktivität in der Hypopharynx-Drüse wie auch in der Mandibel-Drüse unter 1 % der Gesamtaktivität. Somit kann festgestellt werden, daß Carbaryl nur in Mengen, die im pico-Gramm (10^{-12}g) Bereich liegen, in die Drüsen aufgenommen werden.

3.5.2. Diflubenzuron

Auch an Bienen verfüttertes Diflubenzuron wird nach der Passage von der Honigblase in den Mitteldarm resorbiert und kann schon nach 15 min. in der Haemolymphe nachgewiesen werden (Tab. 5). Ob bei der zunächst festzustellenden Anreicherung in der Haemolymphe auch eine Diffusion des Wirkstoffs aus der Honigblase beteiligt ist, wurde bisher nicht näher untersucht. Obwohl Diflubenzuron in rund 100-fach höherer Dosierung als Carbaryl verabreicht wurde, liegt die Markierung in der Haemolymphe stets unter 1 % der Gesamtaktivität. Bedingt durch diese geringen Wirkstoffmengen wird auch von den Geweben der Restkörper-Fraktion nur wenig Diflubenzuron aufgenommen. Weiterhin ist festzustellen,daß ein hoher Prozentsatz von Diflubenzuron wesentlich länger als Carbaryl im Mitteldarm verbleibt, wo nach 24 Stunden noch eine hohe Markierung nachzuweisen ist. Erst nach 48 Stunden ist der Wirkstoff bis auf eine geringe Restaktivität im Mittel- und Dünndarm ins Rektum übergegangen.

Inkubations-zeit in h	Honigblase	Mittel-Darm	Dünn-Darm	Haemolymphe	Malpighi Gefäße	End-Darm	Hypoph. Drüse	Mandibel-Drüse	Hinterkopf-Drüse	Thor. Drüse	Restkörper	Summe
1/4	1272	945	190	1289	352	402	8	13	22	26	957	5476
1/2	824	1514	407	593	323	2508	30	57	20	41	2317	8634
1	1794	1933	168	193	336	1980	18	15	10	0	1707	8154
2	381	2250	118	600	263	5724	26	24	21	17	1310	10734
4	251	1467	119	163	330	7500	20	11	23	5	1366	11255
6	169	999	64	85	190	6550	14	6	8	7	721	8813
24	52	161	36	128	65	12807	18	21	14	23	298	13623
48	2	34	38	148	30	5220	20	56	23	38	193	5802

Tab. 4: Gehalt an Radioaktivität (dpm) der verschiedenen Gewebe nach unterschiedlichen Inkubationszeiten bei ^{14}C-Carbaryl Honigwasser-Fütterung an 8 Tage alte Bienen. Die Werte sind Mittelwerte aus jeweils 2 Messreihen. Alle Werte sind gegen den Gewebespezifischen Quench und den Background korrigiert. Alle Proben bestehen aus dem kompletten Organ. Lediglich von der Haemolymphe wurden pro Biene nur 5 µl entnommen, was etwa 1/4 des Gesamtvolumens entspricht. Die restlichen 3/4 sind im Präparations-Ringer enthalten, diese Proben wurden daher zusammengefaßt.

Auch hier zeigt sich, daß nur wenig des von einer Biene aufgenommenen Diflubenzurons resorbiert wird. Der größte Teil wird nach der Passage des Darmtrakts bzw. durch Exkretion über die Malpighischen Gefäße in der Kotblase akkumuliert. Demzufolge gelangen auch nur geringe Mengen Diflubenzuron in die an der Sekretion von Larvenfuttersaft beteiligten Drüsen. In der Hypopharynx- und in der Mandibel-Drüse kann, wie auch in den übrigen Drüsen, nur eine geringe Aktivität nachgewiesen werden, die jeweils unter 1 % der Gesamtaktivität / Biene liegt. Diflubenzuron, das in einer Dosierung von 1,2 µg /Biene verabreicht wurde, wird somit von den Drüsen, die den Wirkstoff mit dem Sekret an die Larven weitergeben könnten, nur in Mengen, die im ng Bereich liegen, aufgenommen.

Inkubations-zeit in h	Honig-Blase	Mittel-Darm	Dünn-Darm	Haemo-lymphe	Malpighi Gefäße	End-Darm	Hypoph. Drüse	Mandibel-Drüse	Hinterkopf-Drüse	Thor. Drüse	Rest-körper	Summe
1/4	11800	41217	46	541	135	245	28	14	18	39	1875	55958
1/2	4499	53976	15	190	201	233	42	32	33	38	1756	61015
1	1476	66028	50	101	69	428	48	30	23	64	1245	69562
2	104	49687	65	128	89	528	108	27	11	51	2305	53103
4	347	52673	64	134	115	493	104	9	7	51	2571	56568
6	143	41635	61	194	179	500	219	13	15	34	3219	46212
24	237	29122	88	147	113	6352	128	26	13	144	3181	39551
48	119	504	117	188	94	48198	74	44	29	108	2339	51814

Tab. 5: Gehalt an Radioaktivität (dpm) der verschiedenen Gewebe nach unterschiedlichen Inkubationszeiten bei ^{14}C-Diflubenzuron-Honigwasser-Fütterung an 8 Tage alte Bienen. Die Werte sind Mittelwerte aus jeweils 2 Messreihen. Alle Werte sind gegen den Gewebespezifischen Quench und den Background korrigiert. Alle Proben bestehen aus dem kompletten Organ. Lediglich von der Haemolymphe wurden pro Biene nur 5 µl entnommen, was etwa 1/4 des Gesamtvolumens entspricht. Die restlichen 3/4 sind im Präparations-Ringer enthalten, diese Proben wurden daher zusammengefaßt.

4. Diskussion

4.1. Prüfverfahren: Insektizid-Fütterung an Völker in Flugzelten

Wie Berichte der Herren Dr. Pinsdorf, Dr. Gerig und Dr. Dustmann und eigene Erfahrungen bestätigen, tritt auch in Flugzelten mit blühenden Trachtpflanzen eine Störung des Flugverhaltens der Bienen auf. Diese Störung ist somit in den hier durchgeführten Untersuchungen nicht durch die fehlenden Trachtpflanzen in den Flugzelten bedingt, könnte jedoch durch den fehlenden Anreiz zum Blütenbesuch verstärkt sein. Vergleichende Untersuchungen hierzu wurden bisher nicht durchgeführt. Wie Herr Dr. Gerig mitteilte (vergl. auch: Van Praagh, 1972, 1974), gelingt es in Flugzelten mit kuppelförmiger Decke, die Bildung sog. "trapping centers" mit den dafür typischen Bienenansammlungen zu reduzieren, jedoch nicht gänzlich zu verhindern. Ebensowenig ist es möglich, den ständigen Beflug der Seitenwände und der Decke durch ein über das Flugzelt gelegtes Netz, das die Begrenzung des Flugradius für die Bienen deutlicher markieren soll, wesentlich zu verringern (Van Praagh, pers. Mitt.). Inwieweit diese Begrenzungsmarkierung von den Bienen erlernt werden kann, so daß es nur noch unerfahrene Bienen sind, die gegen die Gaze fliegen, ist nicht geklärt. Versuche hierzu könnten einen Beitrag zum Verständnis und auch zur Verbesserung der Haltungsbedingungen von Bienen in Flugzelten und Flugräumen leisten. Bisher unverstanden ist auch, warum es nicht gelingt, alle oder zumindest den Großteil der Flugbienen auf die Futterstelle zu dressieren. Dabei ist es bemerkenswert, daß die Sammelaktivität vornehmlich darauf be-

schränkt ist, Honig-Zuckerwasser einzutragen. Bei der Bienenhaltung in Flugzelten mit künstlichen Futterstellen ist dies z.T. zwar auch darauf zurückzuführen, daß der gemahlene Pollen in den Futterschalen, insbesondere bei hoher Luftfeuchtigkeit, verklebt und daher von den Bienen schlecht gehöselt werden kann. Andererseits kann diese geringe Pollensammelaktivität aber auch in Flugräumen bei niedriger Luftfeuchtigkeit (20 - 30 %) beobachtet werden.
Eine Störung des Flug- und Sammelverhaltens der Bienen wie auch die Einschränkung der Brutaufzuchtrate treten bei gleichem Futterangebot sowohl bei der Bienenhaltung in Flugräumen als auch in Freilandflugzelten auf. Bei weiteren Untersuchungen zur Verbesserung der Käfighaltung der Bienen sollte daher davon ausgegangen werden, daß nicht allein physikalische Parameter wie Licht, Temperatur und Luftfeuchte das Verhalten der Bienen beeinflussen. Vielmehr sollte eine Störung der Homöostase der Völker durch die Einengung der Aktionsmöglichkeiten (kleiner Flugradius, gleichförmige, reizarme Umwelt) und die unzureichende Attraktivität bzw. Qualität des Futterangebots als Ursache für die verminderte Brutaufzucht in Betracht gezogen werden.

4.1.1. Beurteilung des Prüfverfahrens

Das Verfahren "Insektizidfütterung an Völker in Flugzelten" ermöglicht im Gegensatz zu einer Mittelprüfung in Flugzelten mit kontaminierten Trachtpflanzen eine gute Quantifizierung der in die Völker gelangenden Insektizidmenge. Zudem ist es möglich, den Zeitpunkt der Mittelprüfung unabhängig vom Blühtermin der Trachtpflanzen zu wählen und auf der gleichen Fläche mehrere Versuchsserien nacheinander durchzuführen.

Nachteilig ist, daß die Ermittlung der spontanen Brutausfallrate nicht gleichzeitig mit der Mittelprüfung im Testvolk selbst durchgeführt werden kann. Wird die Kontrolle vor der Insektizidprüfung durchgeführt, so werden die Ergebnisse verfälscht, da je nach Witterung und Dauer der Flugzelthaltung unterschiedliche spontane Brutausfallraten zu erwarten sind. Wie die stark differierenden spontanen Brutausfallraten in den beiden Flugzelt-Völkern zeigen, muß aber auch von Volk zu Volk mit Schwankungen in der Brutaufzuchtrate gerechnet werden, so daß Vergleichswerte aus Kontrollvölkern nicht zur Korrektur der Insektizid-bedingten Ausfälle herangezogen werden können. Da zudem der hohe Brutausfall bei trachtlos im Flugzelt gehaltenen Völkern eine subletale Schädigung auch der überlebenden Larven vermuten läßt, sind die Voraussetzungen für eine Prüfung von Insektizidwirkungen auf Bienenbrut mit diesem Verfahren nicht sehr günstig. Nicht zuletzt spricht auch die hohe Kostenbelastung, die durch die Schädigung der Völker zustande kommt, gegen die Anwendung dieses Testverfahrens.

4.2. Insektizidfütterung an auf Brutwaben gekäfigte Ammenbienen

Die hohen Brutausfälle und die unzureichende Pflege der Larven, die bei den Untersuchungen zur Eignung dieses Testverfahrens festgestellt wurden, sind vermutlich weniger durch das Entkommen der Ammen bedingt, als vielmehr durch die unnatürliche Käfighaltung der Brutpflegeeinheiten. Darauf weisen auch Untersuchungen von Barker und Taber (1977) hin, die abgeschlossene Ableger, die nur aus Ammen, einer Wabe mit offener Brut, einer gekäfigten Königin und 2 Futterwaben

bestanden, mit Insektizidhaltigem Futterteig fütterten. Dabei ergaben sich in 3 Versuchen schon für die Kontrollen Larvenausfälle von 49 %, 71 % und 76 %.

4.2.1. Beurteilung des Verfahrens

Abgesehen von den hohen Brutausfallraten hat das Verfahren „Insektizidfütterung an auf Brutwaben gekäfigte Ammenbienen" einen entscheidenden Nachteil: Die Insektizidwirkung auf eine Larvengruppe ist jeweils über eine bestimmte Anzahl Ammen zu definieren. Das heißt, es wäre notwendig, eine neue Größe einzuführen, z.B.: LC 50 bei Fütterung von x Ammen, die y Larven versorgen. Dies gilt generell für alle Testverfahren, bei denen die Stockbienen in den Fütterungsprozeß einbezogen sind. Die in einem solchen Verfahren ermittelte Letalkonzentration (Barker u. Taber, 1977; Barker u. Waller, 1978; Gijswijt, 1978) gibt dabei nicht die Konzentration an, bei der die Hälfte der Bienenlarven abstirbt, sondern die Konzentration in der Futterlösung, die zur Erzielung dieses Effektes den Stockbienen verabreicht werden mußte. Sie wird in der Regel erheblich höher liegen, als bei Prüfverfahren, die es erlauben, das Insektizid direkt den Larven zu applizieren.

4.3. Prüfverfahren: Direkte Applikation des Insektizids an Bienenlarven auf Waben in freifliegenden Völkern

4.3.1. Larventest in Beobachtungsvölkern

Wie sich bei den Untersuchungen zur Anwendbarkeit dieses Testverfahrens herausstellte, muß bei der Erfassung der Insektizid-bedingten Brutausfallrate beachtet werden, daß die

Bienen tote Brut aus verdeckelten Zellen oftmals nicht entfernen. Wie Rothenbuhler (1964) zeigen konnte, ist die Verhaltenssequenz Öffnen der Zellen und Ausräumen der toten Brut genetisch fixiert. Da es sich dabei um 2 nicht gekoppelte rezessive Allele handelt, kommt es bei der Paarung z.B. einer für diese Allele homozygoten Königin mit einem Drohn, der die dominanten Allele besitzt, in der F_1-Generation zu Arbeite - rinnen, bei denen keiner dieser Verhaltensschritte ausgeprägt ist. Bei der Rückkreuzung entstehen hingegen zu je 1/4 Arbeiterinnen, die nur das eine oder andere Verhalten zeigen. Diese Arbeiterinnen öffnen entweder die Zellen, räumen jedoch die toten Bienen nicht aus, oder sie räumen die Zellen nur dann aus, wenn man die Zelldeckel öffnet. Letzteres Verhalten wurde bei der Kontrolle der Testareale in meinen Beobachtungsvölkern festgestellt. Da aber auch nach der Insektizidapplikation in Magazinvölkern mehrmals tote Streckmaden oder Vorpuppen in verdeckelten Zellen gefunden wurden, muß angenommen werden, daß auch in diesen Völkern Arbeiterinnen vorhanden waren, deren Hygieneverhalten nicht oder nur teilweise ausgeprägt war. Aufgrund der unkontrollierbaren Paarung auf Drohnensammelplätzen und der Mehrfachpaarung der Bienenkönigin kann nicht vorhergesagt werden, mit welcher Häufigkeit diese Hybridbienen mit unvollständigem Verhaltensmuster auftreten und in welchen Völkern sie vorkommen. Bei der Bestimmung der Brutausfallrate müssen daher stets auch die verdeckelten Zellen geöffnet werden, um tote aber nicht ausgeräumte Brut zu erfassen.

Bei Langzeitbeobachtungen in Völkern, bei denen das Fütterungsverhalten der Ammenbienen vom Boden der Brutzellen aus mit einer Videokamera aufgezeichnet wurde (Browers, unver-

öffentlicht), ergaben sich keinerlei Hinweise darauf, daß die Ammenbienen bei Inspektions- oder Fütterungsbesuchen Futter aus den Zellen entfernen (de Wilde, pers. Mitt.). Daher kann als wahrscheinlich angenommen werden, daß das kontaminierte Testgemisch von den Bienen nicht in Brutzellen außerhalb des Testareals umgetragen wird. Die hier gemachte Feststellung, daß die Effekte des applizierten Wirkstoffes auf die jeweiligen Larven, denen er appliziert wird, beschränkt bleiben, wird damit bestätigt.

4.3.2. Beurteilung des Testverfahrens

Das Testverfahren "Direktapplikation des Insektizids an Larven auf Brutwaben in Beobachtungsstöcken" zeichnet sich gegenüber allen anderen hier dargestellten Verfahren durch eine äußerst geringe versuchsbedingte Brutausfallrate aus. Somit können mit diesem Verfahren auch noch geringe Insektizid-bedingte Brutausfälle sicher erkannt werden. Neben dieser hohen Sensitivität hat das Verfahren den Vorteil, daß das Pflegeverhalten der Ammenbienen beobachtet werden kann und somit auch evtl. Repellent-Wirkungen eines Insektizids festgestellt werden können. Eine derartige Nebenwirkung könnte eine Vernachlässigung auch der unbehandelten Brut bewirken und damit zu zusätzlichen Brutausfällen führen. Es lassen sich also zum einen die Testbedingungen ständig kontrollieren, zum anderen können auch für die Beurteilung eines Insektizids wesentliche Beobachtungen gemacht werden. Darüberhinaus kann auch der Zeitpunkt des Absterbens vergifteter Larven bestimmt werden, was insbesondere bei Vergiftungsversuchen mit mehrmaliger Verfütterung subletaler Dosen von Bedeutung ist. In Beobachtungsstöcken mit senkrecht

zu den Schaufenstern ausgerichtetem Wabenbau ist es möglich, auch die Futteraufnahme der Larven zu beobachten. Damit ist eine wichtige Voraussetzung gegeben, den Zeitraum zu bestimmen, in dem eine bestimmte Menge Testfutter von den einzelnen Larvenstadien aufgenommen werden kann. Ziel weiterer Untersuchungen wird sein, die angebotene Futtermenge so zu variieren, daß sie in jedem Falle vor dem Absterben der Larve vollständig aufgenommen wird. Das Prüfverfahren, mit dem sich eine sichere Bestimmung der LC 50 durchführen läßt, ist dann auch zur Ermittlung der LD 50 geeignet.

Das Testverfahren läßt sich auch auf Magazinvölker übertragen. Dort können, da größere Brutmengen zur Verfügung stehen, mehrere Testserien auf einmal durchgeführt werden.

4.3.3. Larventest in Magazinvölkern

Die für die Testvölker bestimmte spontane Brutausfallrate von 7 % stimmt gut mit Literaturangaben überein, nach denen mit saisonalen Schwankungen 6 - 16 % als normal anzusehen sind (Woyke, 1977). Auch der Mittelwert der O-Kontrollen liegt mit 16 % noch in diesem Bereich. Die Brutausfälle können im einzelnen durch die Manipulation der Völker, die Entnahme der bienenfrei gemachten Waben oder durch die Abkühlung, evtl. auch durch die Verletzung einzelner Larven bei der Insektizidapplikation verursacht werden. Da die O-Kontrollen 7 % spontane Brutausfälle beinhalten, darf festgestellt werden, daß die experimentell bedingten Störeffekte auf die Bienenbrut auch bei der Applikation des Insektizids an Larven in Magazinvölkern gering sind. Damit ist eine wesentliche Voraussetzung für die routinemäßige

Anwendung dieses Testverfahrens zur Bestimmung der Toxizität von Insektiziden und anderen Agrochemikalien für Bienenlarven erfüllt. Atkins et.al. (1979), die völlig unabhängig ein ähnliches Testverfahren entwickelten, fanden bei dessen Anwendung vereinzelt hohe Brutausfälle in unmittelbarer Nähe der Testareale. Die Autoren werteten dies als Hinweis auf einen Transfer des applizierten Insektizids durch die Ammenbienen. Da die Beobachtung nur in wenigen Völkern und dort nur in Einzelfällen gemacht wurde, nehmen sie an, daß es sich um ein variables Verhalten der Bienen handelt. Da in diesen Untersuchungen den Larven in Aceton gelöste Insektizide ohne weiteren Futterzusatz appliziert wurden, kommt als mögliche Ursache für die beobachteten Brutausfälle auch eine Störung des Pflegeverhaltens der Ammen in Frage. Dabei ist es denkbar, daß insbesondere bei eng aneinandergrenzenden Versuchs- und Kontrollarealen, das Aceton von den Pflegebienen wahrgenommen wird und der unnatürliche chemische Reiz die Ammenbienen veranlaßt, das Brutnest in diesem Bereich aufzulösen. Eine derartige Störung des Pflegeverhaltens ist bei der Applikation des Insektizids in Gelée royale-haltigem Testfutter ausgeschlossen.

So kann festgestellt werden, daß es auch mit diesem Verfahren möglich ist, eine sichere Bestimmung der LC 50 durchzuführen. Hierfür spricht auch die Reproduzierbarkeit der Testergebnisse, die bei der Toxizitätsprüfung für DIMILIN in der geringen Streuung der Mortalitäts-Mittelwerte zum Ausdruck kommt.

Die mit 15,9 ppm DIMILIN 25 WP bestimmte LC 50 entspricht ungefähr 1/200 der vom Hersteller als höchstzulässig ange-

gebenen Aufwandmenge. Dies bedeutet, daß unter Freilandbedingungen selbst noch nach 200-facher Verdünnung der Spritzbrühe durch die Stockbienen mit deutlichen Brutschäden in Bienenvölkern gerechnet werden muß. Da auch bei anderen spezifisch larviziden Wirkstoffen mit ähnlich niedrigen LC 50 Werten gerechnet werden kann, wird deutlich, daß eine Ergänzung der Zulassungsprüfung von Pflanzenbehandlungsmitteln durch Bienenlarven-Toxizitätstests unbedingt erforderlich ist.

4.3.4. Beurteilung des Verfahrens

Der hier beschriebene Apis-Larven-Test in Bienenvölkern ist als Routineverfahren geeignet. Wenn 5 starke und gut brütende Bienenvölker zur Verfügung stehen, kann eine Mittelprüfung mit eingearbeitetem Testpersonal in 2-3 Wochen durchgeführt werden. Außer der Ermittlung der LC 50 können subletale Schädigungen, die Entwicklungsstörungen verursachen, durch Kontrolle der schlüpfenden Imagines festgestellt werden. Hierfür müssen die Waben nach dem Verdeckeln der Brut dem Volk entnommen und bis zum Schlupftermin im Brutschrank aufbewahrt werden. Eine derartige Ergänzung der Prüfmethode kann speziell bei solchen Insektiziden von Bedeutung sein, die als Entwicklungshemmer konzipiert sind (z.B. Insekten Hormone, Juvenoide,Drüsen Inhibitoren, Häutungshemmer).

4.4. Prüfverfahren: Insektizid-Fütterung an in vitro-aufgezogene Bienenlarven

Bei der in vitro-Aufzucht von Bienenlarven auf halbsynthetischen Diäten muß berücksichtigt werden, daß der Darm fressender Larvenstadien geschlossen ist und die Larven

erst im Streckmadenstadium, wenn der Darm zum Rektum durchbricht, defäkieren. Da die Larven somit nur eine begrenzte Nahrungsmenge aufnehmen können und überflüssige Nahrungsbestandteile nicht ausgeschieden werden, ist für das Wachstum und die Entwicklung der Larve zur Imago eine ausgewogene Zusammensetzung der angebotenen Nahrung von entscheidender Bedeutung. Ist das Futter nicht auf die Bedürfnisse der Larven abgestimmt, führt dies zum Absterben der Larve und zwar besonders häufig beim Übergang vom Streckmadenstadium zur Vorpuppe. Vermutlich kommt es bei mangelhafter oder unbalanzierter Nahrung zu einer Störung der Metamorphose, was auf Fehlleistungen des endokrinen Systems schließen läßt. Andererseits zeigen die Ergebnisse der Aufzuchtserien mit den Diäten 16 - 26, daß innerhalb einer großen Variationsbreite eines abgestimmten Nährstoffangebotes Arbeiterinnen entstehen können. Wird der Gehalt essentieller Nährstoffe im Futter reduziert (Verringerung des Gelée royale-Gehalts), so entstehen mit geringer werdender Überlebensrate vorwiegend Arbeiterinnen, während Königinnen unter diesen Bedingungen nicht mehr oder nurmehr vereinzelt entstehen. Erhitzt man das Futter, wobei vor allem Vitamine verlorengehen, aber auch Proteine zerstört werden, so zeigt sich ebenfalls eine starke Besetzung der Arbeiterinnenkaste. Die Mindestvoraussetzungen für die Determination zur Arbeiterin sind somit auch noch bei mangelhaftem Angebot essentieller Nährstoffe gegeben.

Wird andererseits das Futter mit essentiellen Nährstoffen angereichert (Zugabe von Hefeextrakt: Mineralsalze, Vitamine, Aminosäuren), so ist eine deutliche Tendenz zur vermehrten Ausprägung von Königinnen und Intercasts zu beobachten. Diese

Ergebnisse deuten darauf hin, daß bei der Aufzucht von Bienenlarven auf halbsynthetischen Diäten durch den Gehalt des Futters an essentiellen Nährstoffen ein entscheidender Einfluß auf die Kasten-Determination ausgeübt wird. Sie sprechen gegen die Annahme eines spezifischen Königinnen-Determinators (vergl. Rembold, 1974).

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse endokrinologischer und elektrophysiologischer Untersuchungen zahlreicher Autoren an Arbeiterinnen und Königinnenlarven stellte Beetsma (1979, Autoren siehe dort) eine umfassende Hypothese zur Kastendetermination bei der Honigbiene auf. Nach dieser Hypothese wirkt der Glucose-Gehalt des Larvenfutters, der im Königinnenfutter höher ist, phagostimulierend auf die Larve. Über die Quantität des aufgenommenen Futters wird die Aktivität der CA und damit die Syntheserate bzw. Ausschüttung von JH reguliert. Letztlich wird dann über den Juvenilhormon Titer die Differenzierung der Kasten bestimmt.

Die oben gemachte Feststellung steht nicht notwendigerweise im Widerspruch zu dieser Hypothese: Bei einer erhöhten Futteraufnahme kommt es auch zu einer vermehrten Aufnahme essentieller Nährstoffe. Es kann daher ebenso angenommen werden, daß die Aktivität der CA auch durch die Qualität des aufgenommenen Futters reguliert wird. Wichtig ist in beiden Fällen, daß im Bienenvolk die Futteraufnahme einer Königinnenlarve überoptimiert wird, um sicherzustellen, daß in Weiselzellen keine Intercasts auftreten. Für die Determination der Larven zu Arbeiterinnen genügt es, balanzierte Minimalbedingungen zu schaffen.

4.4.1. Beurteilung des Verfahrens

Das Insektizid-Prüfverfahren mit in vitro-aufgezogenen Bienenlarven hat den großen Vorteil, unabhängig von Einflüssen des Bienenvolkes unter konstanten und reproduzierbaren Bedingungen durchgeführt werden zu können. Da die Larven unter permanenter Beobachtung stehen, läßt sich feststellen, wann eine bestimmte kontaminierte Futtermenge aufgenommen ist. Damit ist es möglich, die Toxizität von Pflanzenbehandlungsmitteln für Bienenlarven als LD 50 zu bestimmen. Da stets gleichaltrige Larven angesetzt werden, können auch Entwicklungsstadien - spezifische Insektizideffekte qualitativ und quantitativ untersucht werden. Darüberhinaus können bei Verfütterung subletaler Dosen auftretende Kulminierungseffekte oder Spätschäden an den Imagines ebenso wie Synergismuswirkungen bei kombinierter Fütterung zweier oder mehrerer Präparate analysiert werden. Mit abgestorbenen Larven können, anders als im Volk, wo sie ausgefressen werden, evtl. Nachuntersuchungen (z.B. Todesursache) vorgenommen werden. Werden Bienenvölker in Winterflugräumen gehalten, so stehen auch während der kalten Jahreszeit genügend Larven für das Testverfahren zur Verfügung.Da die in vitro-Aufzucht von Arbeiterinnen bisher nur mit erheblichen Ausfällen gelingt, das Testverfahren prinzipiell jedoch zahlreiche Vorteile hat, ist zu überlegen, ob es nicht auch mit wesentlich einfacher aufzuziehenden Königinnen-Larven durchgeführt werden könnte (Czoppelt u. Rembold, 1981). Zwar treten auch hierbei gelegentlich Abweichungen in der Kastendetermination auf, evtl. vorhandene kastenspezifische Unterschiede in der Empfindlichkeit gegenüber Insektiziden

können jedoch vernachlässigt werden, wenn die Toxizität eines Präparats in Kategorien, denen jeweils bestimmte LD 50 Intervalle zugeordnet sind, klassifiziert wird (z.B. 0 - 10 µg/Larve = hoch toxisch, 11 - 100 µg/Larve = mäßig toxisch, > 100 µg/Larve = nicht toxisch). Eine solche Klassifizierung ist auch bei der Beurteilung der Toxizität von Insektiziden gegenüber Bienenimagines üblich.
Gelingt die in vitro-Aufzucht von Bienenlarven in verschiedenen Labors mit reproduzierbarer Aufzuchtrate, wozu weitere Untersuchungen mit eingearbeitetem Testpersonal notwendig sind, so steht für die Mittelprüfung an Bienenlarven eine Testmethode zur Verfügung, die insbesondere dazu geeignet ist, spezielle Fragestellungen zur Wirkung von Insektiziden auf Bienenlarven zu untersuchen. Da das Verfahren kostenaufwendig ist, läßt sich eine Empfehlung für Routinetests allerdings nur mit Vorbehalten aussprechen.

4.5. Tracerversuche zur Passage von ^{14}C-Carbaryl und ^{14}C-Diflubenzuron durch Ammenbienen

4.5.1. Carbaryl

Die in den Tracerversuchen den einzelnen Bienen-Arbeiterinnen applizierte Carbaryl-Dosis liegt in dem Bereich der Wirkstoffmenge, die nach einer KWP 61-Anwendung im Freiland (höchstzulässige Aufwandmenge: 150 g/100l; 50 % Carbaryl-Gehalt) auch noch nach mehreren Verdünnungsschritten durch Zwischenfütterungen unter den Stockbienen an eine Ammenbiene gelangen kann. Insofern gleichen die Versuchsbedingungen durchaus einer Vergiftungssituation im Freiland.

Aus den Ergebnissen geht hervor, daß von adulten Bienen aufgenommenes Carbaryl schon nach wenigen Stunden den Darmtrakt passiert hat und in der Kotblase angereichert wird. Da die Bienen niemals im Stock koten, sondern stets im Flug, wird ein Großteil des mit der Nahrung aufgenommenen Carbaryls rasch wieder aus dem Stock entfernt. Durch Carbaryl, das in die Futtervorräte gelangt ist, können hingegen noch über mehrere Wochen hin Bienen und Brut geschädigt werden (Buchner, 1970). Von dem geringen Anteil Carbaryl, das von den Bienen resorbiert wird, gelangen nur wenige pg in die an der Sekretion von Larvenfuttersaft beteiligten Drüsen. Es ist anzunehmen, daß ein Teil des Carbaryls auch in den Drüsenzellen durch Decarboamylierung (Cocks, 1975) abgebaut wird oder Metabolite in die Drüsen gelangen. Über deren Toxizität für Bienen ist bisher nichts bekannt. Auch wenn Carbaryl oder dessen Metabolite in den Futtersaft sezerniert werden und die gesamte Sekretmenge an eine Larve verfüttert wird, ist die darin enthaltene Giftstoffmenge nicht ausreichend, um diese Larve abzutöten. Da die LD 50 von Carbaryl für Larven bei 1,5 µg liegt (Atkins, 1979), müßte durch Metabolitwirkung oder durch synergistische Effekte eine Toxizität erreicht werden, die um das 10^4 - 10^5-fache höher ist als die von Carbaryl. In den Tracerversuchen hat sich auch bei Carbaryldosierungen, die über der im Mittel angebotenen Dosis lagen, weder in den Kurzzeit- (4 Stunden) noch in den Langzeitversuchen (24 Stunden) eine Anreicherung in den Futtersaftdrüsen gezeigt. Da noch höhere Dosierungen zum Absterben der gefütterten Bienen führen würden, ist eine Schädigung der Larven durch Verfütterung von Carbaryl-kontaminiertem Futtersaft nicht zu erwarten. Vermutlich sind daher bei Carbaryl-be-

dingten Brutschäden junge Larvenstadien (L_1, L_2, L_3) nicht betroffen. Es muß angenommen werden, daß die älteren und absolut auch weit mehr Larvenfutter aufnehmenden Stadien (L_4, L_5) dadurch geschädigt werden, daß an sie Carbaryl direkt mit kontaminierter Tracht verfüttert wird. Carbaryl müßte demnach über die Honigblase der Ammenbienen an die Larven gelangen. Wie eingangs erwähnt, ist auf diesem Wege eine chemische Veränderung des Wirkstoffs nicht anzunehmen.

Da Carbaryl systemische Wirkung hat, muß allerdings berücksichtigt werden, daß schon in der Pflanze Metabolite entstehen können, die neben Carbaryl in den Pollen und Nektar gelangen können (Müller et al.; 1975). Dieser Gesichtspunkt muß bei allen systemischen Präparaten bedacht werden. Gegebenenfalls sollten daher auch Metabolite in die Mittelprüfung mit einbezogen werden.

4.5.2. Diflubenzuron

Geht man von der höchstzulässigen Aufwandmenge für DIMILIN 25 WP aus (300 g/100l; 25 % Diflubenzuron-Gehalt), so würde eine Sammelbiene, die 25 µl der Spritzbrühe aufnimmt, maximal 18,8 µg des Wirkstoffes Diflubenzuron in den Stock zurücktragen. Dabei ist allerdings nicht berücksichtigt, daß sie zur Aufrechterhaltung des Stoffwechsels während des Rückflugs Honigblaseninhalt in den Mitteldarm überführt. Zudem weist Gijswijt (1978) darauf hin, daß Diflubenzuron aufgrund seiner geringen Wasserlöslichkeit (0,2 ppm bei 20° C) nur in sehr geringen Mengen mit der Spritzbrühe aufgenommen werden kann. Es muß also davon ausgegangen werden, daß die den Versuchsbienen applizierte Wirkstoffmenge von 1,2 µg nur in Extrem-

fällen in dem Bereich liegt, der nach Zwischenverdünnungen im Stock an eine brutpflegende Biene gelangen kann. Wird DIMILIN hingegen mit dem Nektar oder Pollen eingetragen, so wird eine so hohe Endkonzentration in den Ammenbienen vermutlich nicht erreicht.

Auch bei der Verfütterung von Diflubenzuron an adulte Bienen hat sich gezeigt, daß der überwiegende Anteil des Wirkstoffes zusammen mit möglicherweise entstandenen markierten Metaboliten, in die Kotblase gelangt und nur geringe Mengen resorbiert werden. Diese Ergebnisse, wie auch die festgestellte rasch einsetzende Exkretion durch die Malpighischen Gefäße, stehen in guter Übereinstimmung mit Berichten von Ivie und Wright (1978), die nach topikaler Applikation von ^{14}C-Diflubenzuron an Hausfliegen (Musca domestica) und Stallfliegen (Stomoxys calcitrans) bis zu 50 % der Aktivität in den Exkrementen wiederfanden. Nur zwischen 0,4 % und 6,9 % der Aktivität wurde im Ganzkörperhomogenat gefunden, der Rest war auf der Cutikula verblieben. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Still und Leopold (1978) nach topikaler Applikation, Injektion und Fütterung von ^{14}C-Diflubenzuron bei einer Baumwollwanze (Autonomyus grandis).

Die in den Futtersaftdrüsen gefundenen Diflubenzuron-Mengen von wenigen ng (maximal ca. 6 ng) dürften aus den oben erwähnten Gründen nach einer DIMILIN-Spritzung im Freiland nur in seltenen Fällen erreicht werden. Zu bedenken ist allerdings, daß adulte Bienen auch eine massive DIMILIN-Intoxikation überleben werden, da der Wirkstoff nur eine geringe Toxizität für Insekten-Imagines hat. Weiterhin muß berücksichtigt werden, daß auch die LD 50 von Diflubenzuron

für Bienenlarven im ng-Bereich liegt. Darauf deutet die hier ermittelte LC 50 hin, die bei 3,7 ppm (= 39,7 ng Diflubenzuron/10 µl Testfutter) ermittelt wurde. Somit kann nicht völlig ausgeschlossen werden, daß Diflubenzuron, das evtl. mit dem Sekret aus den Futtersaftdrüsen mehrerer stark kontaminierter Ammenbienen an eine Larve abgegeben wird, bei dieser zumindest zu subletalen Schädigungen führen kann.

Inwieweit eine Verstärkung oder Verringerung der Giftwirkung durch Metabolite von Diflubenzuron zu erwarten ist, muß noch ungeklärt bleiben. Über den Metabolismus des Wirkstoffes in Insekten liegen verschiedene Berichte vor, nach denen sowohl ein Abbau durch Hydrolyse als auch durch Hydroxylierung in Frage kommt (Pimikar, 1977; Ivie und Wright, 1978; Chang und Stokes, 1979). Verloop und Ferell (1977) konnten dagegen bei Pieris brassicae keine Metabolisierung von Diflubenzuron feststellen. An Bienen wurden hierüber bisher keine Untersuchungen durchgeführt.

Es kann somit davon ausgegangen werden, daß Brutschäden in Bienenvölkern durch Verfütterung von kontaminiertem Futtersaft nur dann auftreten können, wenn ein Insektizid eine geringe Toxizität für adulte Bienen, aber eine starke larvizide Wirkung hat. Nur dann kann von den Sammel- und Stockbienen so viel des Wirkstoffs aufgenommen werden, daß die Dosis, die in das Sekret der Futtersaftdrüsen gelangt, hoch genug ist, um zu Brutschäden führen zu können. Dies wird nur bei massiver Futter-Kontamination der Fall sein, die dann gegeben sein könnte, wenn von den Bienen eingetrocknete Spritzbrühe z.B. auf Blättern mit Honigtau aufgeleckt wird. Da es dann

ohnehin durch Verfütterung kontaminierter Tracht zu erheblichen Brutausfällen kommen wird, darf angenommen werden, daß Brutschäden, die durch Verfütterung von kontaminiertem Futtersaft bedingt sind, nur eine geringe Bedeutung zukommt.

Weitere Untersuchungen, speziell mit larviziden Wirkstoffen, sind notwendig, um klären zu können, wie Brutvergiftungen bei Bienen im Einzelnen zustande kommen können. Vor allem erscheint es angebracht, zu prüfen, ob die hier in den Futterdrüsen gefundenen Wirkstoffmengen vollständig in das Drüsensekret übergehen und wieviel davon bei der Fütterung einer Larve abgegeben wird. Mit biochemischen Methoden (Ivie und Wright, 1978) ließe sich feststellen, welche Metabolite eines Wirkstoffes in der Biene entstehen und welche davon in den Futtersaft gelangen. Toxikologische Untersuchungen der Metabolite und der synergistischen Effekte zwischen Wirkstoff und Metaboliten sind notwendig, um die Wirkung der mit dem Futtersaft abgegebenen Giftstoffe insgesamt beurteilen zu können.

Da Entwicklungshemmer wie DIMILIN auch ovizide Wirkung haben können (Grosscurt, 1976; Moore et.al., 1978), müssen derartige Effekte bei der Beurteilung von larviziden Wirkstoffen, aber auch von Carbamaten (Grosch und Hoffmann, 1975; Grosch, 1975), berücksichtigt werden. Hierzu ist ein weiteres Testverfahren notwendig, bei dem Bienen-Königinnen die Testsubstanz oral verabreicht und anschließend die Eiablage im Volk quantitativ erfaßt wird. Die Entwicklung der Eier muß über mindestens 3 Tage verfolgt werden, um unfruchtbare Eier und embryonale Letaleffekte erfassen zu können.

Zusätzlich sollte die Entwicklung der Oocyten in den Ovariolen histologisch untersucht werden.

Bei einem Vergleich der hier geschilderten Verfahren für die Prüfung von Pflanzenschutzmitteln auf Bienen-Larven-Gefährlichkeit ist festzustellen, daß eine Quantifizierung toxischer Effekte auf die Bienenbrut nur mit den Verfahren möglich ist, bei denen das Insektizid den Larven direkt appliziert wird. Mit dem Verfahren "Direktapplikation des Insektizids an Bienenlarven auf Brutwaben in freifliegenden Völkern" kann die LC 50 bestimmt werden. Das Verfahren "Direktapplikation des Insektizids an in vitro-aufgezogene Larven" ermöglicht darüber hinaus die Ermittlung der LD 50. Testverfahren, bei denen das Insektizid an Bienenvölker verfüttert wird, bieten, wenn sie nicht in Flugzelten durchgeführt werden, die Möglichkeit, Insektizidwirkungen auf Bienenbrut unter Freilandbedingungen qualitativ zu erfassen.

Als Testverfahren für die routinemäßige Prüfung von Pflanzenbehandlungsmitteln auf Bienen-Larven-Gefährlichkeit bietet sich das erstgenannte Verfahren an. Gegebenenfalls kann die Bestimmung der LC 50 durch eine Freilandprüfung ergänzt werden. Aus den Ergebnissen dieser 2-Schritt-Prüfung kann die Einstufung eines Präparates hinsichtlich einer Gefährdung der Bienenbrut erfolgen. Die bisher vorgenommene Unterscheidung von bienengefährlichen und bienenungefährlichen Pflanzenbehandlungsmitteln sollte durch die Beurteilungkriterien "gefährlich für Flugbienen" und "gefährlich für Bienenbrut" erweitert werden.

Zusammenfassung

Wiederholte Meldungen über durch Insektizide verursachte Brutschäden in Bienenvölkern und der zunehmende Marktanteil larvizider Insektizide machen es notwendig, Testverfahren zur Prüfung von Pflanzenbehandlungsmitteln auf Bienen-Larven-Gefährlichkeit zu entwickeln und ggf. in das amtliche Prüfverfahren für die Mittelzulassung einzubeziehen.

4 verschiedene Prüfverfahren zur Ermittlung der Wirkung von Pflanzenschutzmitteln auf Bienenbrut wurden auf ihre Eignung als Routine-Testverfahren untersucht.

Ein Prüfverfahren, bei dem das Insektizid an Futterstellen den in Flugzelten gehaltenen Bienenvölkern verfüttert wird, erlaubt zwar eine Quantifizierung des in das Volk gelangten Insektizids, eine sichere Beurteilung der Insektizidwirkung auf die Brut ist jedoch nicht möglich, da durch die Haltungsbedingungen in Flugzelten bereits hohe versuchsbedingte Brutausfälle auftreten.

Bei der Verfütterung des Insektizids an auf Brutwaben gekäfigte Ammenbienen kommt es ebenfalls zu hohen versuchsbedingten Brutausfällen, da die Larven unter dem Käfig nicht ausreichend gepflegt werden. Das Verfahren ermöglicht zudem keine exakte Bestimmung der LC 50.

Bei der Direktapplikation des Insektizids an Larven auf Brutwaben in Beobachtungs- oder in Magazinvölkern wird die Aufzucht der Larven in geringem Ausmaß gestört, sodaß eine

Quantifizierung der Insektizidwirkung auch bei Applikation niedriger Dosierungen möglich ist. Mit diesem Verfahren wurde die Toxizität von DIMILIN 25 WP getestet. Sie wurde als LC 50 bei 15,9 ppm ermittelt, was 3,7 ppm Reinsubstanz Diflubenzuron entspricht. Das Verfahren kann für die Routineprüfung von Pflanzenbehandlungsmitteln eingesetzt werden.

Im Rahmen der Entwicklung eines Test-Verfahrens, bei dem das Insektizid an in vitro-aufgezogene Bienenlarven verfüttert wird, wurde nach einer geeigneten Diät für die Aufzucht von Bienen-Arbeiterinnen gesucht. Mit 12 von 27 getesteten Diäten gelang es, zwischen 69 % und 95 % Arbeiterinnen aufzuziehen. Dabei zeigte sich, daß der Gehalt des Futters an essentiellen Nährstoffen einen erheblichen Einfluß auf die Kastendetermination hat. Die stark schwankenden Überlebensraten der Larven erwiesen sich als zu gering,um das Testverfahren routinemäßig und reproduzierbar mit Arbeiterinnenlarven durchführen zu können. Es wird daher empfohlen, die Prüfung von Pflanzenschutzmitteln mit diesem Verfahren mit Larven durchzuführen, die sich vornehmlich zu Königinnen entwickeln, da deren Aufzucht leichter gelingt. Das Aufzuchtverfahren wurde darauf abgestimmt, daß durch direkte Verfütterung von Insektiziden an in vitro aufgezogene Larven die LD 50 ermittelt werden kann.

In Tracerversuchen zur Passage von ^{14}C-Carbaryl und ^{14}C-Diflubenzuron durch Ammenbienen wurde exemplarisch gezeigt, daß die Verfütterung von kontaminiertem Sekret aus denFuttersaftdrüsen an die Larven nur von geringer Bedeutung für das Zustandekommen von Brutschäden in Bienenvölkern ist.

LITERATURVERZEICHNIS

Anderson, L.D. u. Atkins, E.L.
Toxicity of pesticides to hoeybees in laboratory and field tests in southern California.
J. econ. Ent. 51, 103-108 (1958

Anderson, L.D. u. Atkins, E.L.
Pesticide usage in relation to beekeeping.
Ann. Rev. Ent. 13, 213-238 (1968)

Ascher, D.R.S. u. Nemny, N.E.
The ovicidal effect of Pff 60-40 in spodoptera litoralis Boisd.
Phytoparasitica 3, 131-133 (1974)

Ascher, D.R.S. u. Nemny, N.E.
Toxicity of the chitin synthesis inhibitors Diflubenzuron and its dichloro analogues to Spodotera littorales larvae
Pestic. Sci. 7, 1-9 (1976)

Atkins, E.L., Kellum, D. u. Atkins, K.W.
Effects of Pesticides on Apiculture
Univ. of Calif., Riverside, Annual Report (1978)

Altkins, E.L. u. Kellum, D.H.
Effects of Pesticides on Apiculture
Maximizing the effectiveness of honey bees as pollinators
Univ. of Calif., Riverside, Annual Report (1979)

Bäumler, W. u. Salama, H.S.
Some biochemical changes induced by Dimilin in the Gypsy moth Porthetria dispar L.
Z. Angew. Entomol. 81, 304-310 (1976)

Barker, R.J. u. Taber, S. III.
Effects of Diflubenzuron fed to caged honey bees
Environ met. Entomol. 6, 167-168 (1977)

Barker, R.J. u. Waller, G.D.
Effects of diflubenzuron wettable powder on caged honey bee colonies
Environ. Entomol. 7, 534-535 (1978)

Bay, A.R.K. u. Reddy, C.C.
Laboratory toxicity of some insecticides to Apis cerana Indica.
J.apic. Res. 16, 161-162 (1977

Bay, A.R.K. u. Reddy, C.C.
Inhibition of acetylcholinesterase as a criterion to determine the degree of insecticide poisoning in Apis cerana Indica.
J.apic. Res. 16, 112-114 (1977)

Beetsma, J. u. Ten Houten, A.
Effects of juvenile hormone analogues in the food of honeybee colonies.
Z. angew. Ent. 3, 293-300 (1975)

Beetsma, J.
The prozess of queen-worker differentiation in the honeybee
Bee World 60, 24-39 (1979)

Belliardo, F.
Rapid determination of carbaryl residues in honeybees by high pressure liquid chromatography.
J. apic. Res. 4, 197-200 (1977)

Beran, F. u. Glofke, E.
Zur Kenntnis der Wirkung von Pflanzenschutzmitteln auf die Honigbiene. 3. Der Nachweis von Bienenvergiftungen.
Pflanzenschutz Ber. 10, 145-171 (1959)

Bertholf, L.M.
The moults of the honeybee.
J.econ. Ent. 2, 380-384 (1925)

Bertholf, L.M.
Utilization of carbohydrates as food by the honeybee larvae.
J.agric. Res. 35, 429-452 (1927)

Beye, F., Kaeser, W. u. Buchner, R.
Zur Wirkung von Aktivsubstanzen verschiedener Insektizide auf Bienen.
Anz. Schädlingskunde, 32, 121-123 (1959)

Brasse, D.
Untersuchung von Bienen- und Pflanzenproben bei Bienenvergiftungen durch Pflanzenbehandlungsmittel
ADIZ, 8, 245-248, (1979)

Brasse, D.
Bienenschutz - Pflanzenschutz
ADIZ, 6, 170-177 (1980)

Buchner, R.O.
Ein katastrophales Bienensterben im Regierungsbezirk Südbaden.
ADIZ, 9, 223-224 (1970

Buchner, R.O.
Bienenvergiftungen durch Rebschutzmaßnahmen und ihre Verhütung.
Tierärztliche Umschau, 12, 623-629 (1973)

Busch, W.
Schnurrdiburr oder die Bienen. Wilhelm Busch, Gesammelte Werke, Südwest-Verlag

Cavalli-Sforza
Grundbegriffe der Biometrie insbesondere der statistischen Methoden bei der Wertbemessung biologisch wirksamer Substanzen
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1964

Chang, S.C.
Conjugation: the major metabolic pathway of 14C-diflubenzuron in the house fly
J.Econ. Entomol. 71, 31-39 (1978)

Chang, S.C. u. Stokes, J.B.
Conjugation: the major metabolic pathway of 14C-diflubenzuron in the boll weevil
J.Econ. Entomol. 72, 15-19 (1979)

Cocks, J.A.
Inhibition of Carbaryl Metabolism by nitrogen in three species of cockroach and one species of locust
Pestic. Sci. 6, 259-265

Conner, W.E., Wilkinson, C.F. u. Morse, R.A.
Penetration of Insecticides through the foregut of the honeybee
Pestic. Biochem. Physiol. 9, 131-139 (1978)

Czoppelt, Ch. u. Rembold, H.
Wirkung von DIMILIN auf das Wachstum von Bienenlarven bei Aufzucht im Brutschrank
Kurzfassung Entomologentagung St.Gallen 1980.
Mitt.dtsch.Ges.allg.angew.Ent. 3, im Druck

Dietz, A.
Caste determination in honeybees. II Food consumption of individual honeybee larvae, determined with 32P-labeled royal jelly.
Ann.Ent.Soc.Am. 5, 1342-1345 (1970)

Dietz, A. u. Haydak, M.H.
The effect of royal jelly refrigirated for several years on growth and development of larval female honeybees.
J.Georgia Ent.Soc. 4, 203-206 (1970)

Dietz, A. u. Lambremont, E.N.
A method of studying food consumption of live honeybee larvae by liquid scintillation counting.
Ann.Ent.Soc.Am. 5, 1340-1342 (1970)

Dietz, A.
The nutritional basis of caste determination in honeybees.
in: Insect and mite nutrition, North Holland Amsterdam, (1972)

Dietz, A.
Longevity and survival of honeybee larvae on artificial diets.
J. Georgia Ent.Soc. 1, 59-63 (1973)

Dogra, G.S., Ulrich, G.M. u. Rembold, H.
A comparative study of the endocrine system of the honeybee larvae under normal and experimental conditions.
Z.Naturf. 32, 673-682 (1977)

Doull, K.H.
Effect of distance on the attraction of pollen to honeybees in the hive.
J.apic.Res. 13, 27-32 (1974)

Drescher, W. et al.
Vorläufige Richtlinien für die Prüfung von Pflanzenschutzmitteln auf Bienengefährlichkeit.
(1975)

Dustmann, J.H.
Wirkung von Tormona 80 auf Honigbienen.
Allgem. Forstzeitschrift, 45 (1975)

Engels, W.
Erfahrungen mit einem für tropische Apis Arten eingerichteten Behelfs-Bienenflugraum
Insectes Sociaux, 3, 291-293 (1971)

Engels, W.
Caste development in Meliponidae.
Resum. Simpasio Int. sombre Insectos sociales en el Tropico, 1, Cocoyoc (Mexico) (1980)

Egger, A.
Die Nebenwirkungen von DIMILIN auf Bienen.Eine Untersuchung anlässlich einer Flugzeugapplikation im Forst.
Cbl.ges.Forstw., Wien, 94, 65-72 (1977)

Gerig, L.
Bienen und geplante Maikäferbekämpfung im Kt. Thurgau 1973
Schweiz. Bienen-Zeitg., 6, 1-8 (1974)

Gerig, L.
Unterschiede in der Giftempfindlichkeit verschieden schwerer Bienen
Schweiz. Bienen-Zeitg., 1-8 (1975)

Gerig, L.
Bienengiftigkeit der synthetischen Pyrethrine (2. Teil)
Schweiz. Bienen-Zeitg. 4, 155-174 (1981)

Gijswijt, M.J.
Investigations with dimilin on bees - a summary of reports received up to 1978 with critical annotations. Philips Duphar B.V.S Graveland, The Netherlands, Crop Protection Division, Report Nr. 56656/45 A (1978) yz

Gontarski, H.
Larval food and the birth of honeybee queens. Proc.Int.Beekeep.Congr. XVII, 49 (1958)

Graves, J.B. u. Mackensen, O.
Topical application and insecticide resistance studies on the honeybee.
J.econ.Ent. 58, 990-993 (1965)

Gnädinger, F.
Bienenvergiftungen im badischen Rebbaugebiet.
ADIZ, 8, 217-218 (1975) .

Gnädinger, F.
Bienenvergiftungen 1976 in Baden.
ADIZ, 5, 134 (1977)

Grosch, D.S. u. Hoffmann, A.C.
The vulnerability of specific cells in the oogenetic sequence of Bracon hebetor to some degradation products of carbamate insecticides.
Environ.Ent. 6, 1029-1032 (1975)

Grosch, D.S.
Reproductive performance of Bracon hebetor after sublethal doses of carbaryl.
J.econ.Ent. 5, 659-662 (1975)

Grosscurt, A.C.
Diflubenzuron: some aspects of its ovicidal and larvicidal mode of action and on evaluation of its practical possibilities.
Pestic.Sci.,9, 373-386 (1978)

Grosscurt, A.C.
Effects of diflubenzuron on mechanical penetrability, chitin formation and structure of the elytra of Leptinotarsa decemlineata.
J.Insect.Pysiol., 24, 827-831 (1978)

Habowsky, J.E.J. u. Shuel, R.A.
Separation of the protein constituents of the larval diets of the honeybee by continuous flow electrophoresis.
Can.J.Zool., 37, 957-964 (1959)

Hartinger, C.
Zur Wirkung des Entwicklungshemmers DIMILIN auf Gespinstmotten (Yponomeuta ssp.) und ihre Parasiten.
Anz.Schädlingskde., Pflanzenschutz, 49, 156-158 (1976)

Hajjar, N.P. u. Cassida, J.E.
Insecticidal benzoylphenyl ureas: structure-activity. Relationships as chitin synthesis inhibitors.
Science 200, 1499-1500 (1978)

Henschler, D. u. Rhein, W.v.
Änderung des Acetylcholingehalts von Bienenfuttersäften in der Madenentwicklung.
Naturwissenschaften, 47, 326-327 (1960)

Herbert, W.E. u. Shimanuki, H.
Brood rearing capability of caged honeybees fed synthetic diets.
J.apic.Res. 3, 150-153 (1977)

Herbert, W.E.; Shimanuki, H. u. Caron, D.
Optimum protein levels required by honeybees to initiate and maintain brood rearing.
Apidologie, 2, 141-144 (1977)

Herfs, W.D.
Neuregelung zur Prüfung und Zulassung von Pflanzenschutzmitteln unter besonderer Berücksichtigung des Vorratsschutzes.
Anz.Schädlk.Pflanzensch., 6, 81-84 (1971)

Herfs, W.D.
Zulassung und Anwendung von Vorratsschutzmitteln in der BRD
Die Mühle u. Mischfuttertechnik, 28 (1971)

Herfs, W.D.
Amtliche Neuregelung zur Berücksichtigung der Wirkung von Pflanzenschutzmitteln auf Bienen.
ADIZ, 7, 203-206, (1973)

Herfs, W.D.
Über einige internationale Aktivitäten im Bereich der zoologischen Mittelprüfung
Gesunde Pflanze, 5, 100-106 (1974)

Herfs, W.D.
Das Verfahren der Prüfung und Zulassung von Pflanzenbehandlungsmitteln als Beitrag zum Umweltschutz.
Mitt.Biol.Bundesanst., 191, 47-61 (1979)

Hocking, B.
The honeybee and agricultural chemicals.
Bee World, 31, 49-53 (1950)

Hoffmann, J.
Untersuchungen über die Herkunft von Komponenten des Königinnenfuttersaftes der Honigbiene.
Z.Bienenf., 5, 101-111 (1960)

Ishaaya, I. u. Cassida, J.E.
Dietary TH 6040 alters composition and enzyme activity of housefly larval cutile.
Pestic.Biochem.Physiol., 4, 484-490 (1974)

Ivie, G.W. u. Wright
fate of diflubenzuron in stable fly and house fly
J.Agric.Food Chem., 26, 90-94 (1978)

Johansen, C.A.
Honeybee poisoning by chemicals: signs contributing factors, current problems and prevention
Bee World, 60, 109-127 (1979)

Johansen, C.A. u. Kleinschmidt, M.G.
Insecticide formulations and their toxicity to honeybees.
J.apic.Res. 1, 59-62 (1972)

Jung-Hoffmann, J.
Die Determination von Königinnen und Arbeiterinnen der Honigbiene.
Z.Bienenf., 8, 296-322 (1966)

King, C.C.
The effects of fungicides
Gleanings Bee Culture, 87, 678-681 (1959)

Kloft, W.J.; Djalal, A.S. u. Drescher, W.
Untersuchung der unterschiedlichen Futterverteilung in Arbeiterinnengruppen verschiedener Rassen von Apis mellifica L. mit Hilfe von ^{32}Pals Tracer
Apidol., 7, 49-60

Kramer, G.H.
Insulin like hypoglycemic and immunological activities in honeybee royal jelly.
J.Insect.Physiol., 23, 293-295 (1977)

Kroon, G.H.; van Praagh, J.P.u. Velthuis, H.H.W.
Osmotic shock as a prerequisite to pollen digestion in the allimentary tract of the worker honeybee.
J.apic.Res., 3, 177-181 (1974)

Ladas, A.
Der Einfluß verschiedener Konstitutions- und Umweltfaktoren auf die Anfälligkeit der Honigbiene gegenüber zwei insektiziden Pflanzenschutzmitteln.
Apidologie, 3, 55-78 (1972)

Liesche, Ch.
Unterschiede zwischen Freiland- und Flugraumbienen aufgezeigt am Haemolymph-Protein Spektrum verschiedener Altersstadien und an der Größenentwicklung der Hypopharynxdrüsen bei imaginalen Bienen.
Diplomarbeit Univ. Tübingen (1981)

Lukoschus, F. u. Stein, E.
Beitrag zur Frage der Bienenschädlichkeit des Dichlordiphenyltrichloräthan Kaltnebelbelages.
Nachrbl.Deut.Pflanzensch.Dienst, Stuttgart 12, 90-92 (1960)

Matsumura, F.
General principles of insecticide toxicology.
in: Toxicology of insecticides, Chap. 2, Plenum Press N.Y. (1975)

Maurizio, A.
Bestimmung der letalen Dosis einiger Fluorverbindungen für Bienen. Zugleich ein Beitrag für Methodik der Giftbestimmung in Bienenversuchen.
Inter.Cong.Plant.Protec., 4th, (1957, 2, 1709-1713 (1960

Maurizio, A. u. Schenker, P.
Untersuchungen über die Ausscheidung bienengiftiger Pflanzenschutzmittel im Blütennektar.
Mitt.Schweiz.Entomol.Ges., 30, 140-150 (1957)

Metcalfe, J.R.
Experiments to assess the extent of honeybee poisoning by Malathion in Jamaica.
J.apic.Res., 1, 45-58 (1967)

Michael, A.S. u. Ambromowitz, M.
A method of rearing honeybee larvae in vitro.
J.econ.Ent., 48, 43-44 (1955)

Morgan, E.D. u. Poole, C.F.
Chemical control of insect moulting.
Comp.Biochem.Physiol., 57b, 99-109 (1977)

Moore, R.F.; Leopold, R.A. u. Taft, H.M.
Boll weevils: nechanism of trasfer of diflubenzuron from male to female.
J.Econ.Entomol., 71, 587-590 (1978)

Müller, F.; Steche, W. u. Gebbing, H.
Verteilung von Carbaryl in der Weinrebe und seine Einlagerung in Pollen.
Sonderdruck, XXV Int.Apimondia Congr. 1975

Musgrave, A.J.
A bibliography of honeybee toxicology.
Can.Ent., 82, 177-179 (19507

Naton, E.
Zur Prüfung der Nebenwirkung von Pflanzenschutzmitteln auf Nutzarthropoden an der lebenden Pflanze. Die Prüfung mit Phygadeuon trichops Tompson (Ichneumonidae).
Anz.Schädlingsk.Pflanzen-u. Umweltschutz, 51, 136-139 (1978)

Nazer, K.J.; Archer, T.E.; Gary, N.E. u. Marston, J.
Honeybee pesticide mortality: intoxication versus acetylcholinesterase concentration.
J.apic.Res., 1, 55-60 (1974)

Nelson, J.A.
Morphology of the honeybee larva.
J.agricult.Res., 12, 1167-1229 (1924)

O'Brien, R.D.
Barrier systems in insect ganglia and their implication for toxicology.
Fed.Proc., 26, 1056-1061 (1967)

Palmer Jones, T.
Laboratory Methods for measuring the toxicity of pesticides to honeybees.
New Zealand, J.agric.Res., 1, 694-706 (1958)

Praagh, J.P.v.
Towards a controlled - environment room suitable for normal colony life of honeybees. 1. Descriptions and general observations.
J.apis.Res., 2, 77-87 (1972)

Praagh, J.P.v.
De ontwikkeling van een klimaatkamer voor de honingbij.
Promotionsschrift, Univ. Utrecht (1974)

Pimikar, G.D.
Mechanism of resistance to dimilin
Dissertation University of Calif., Riverside, USA (1977)

Rembold, H.; Lachner, B. u. Geistbeck, J.
The chemical basis of honeybee cast formation. Partial purification of queen bee determinator from royal jelly.
J.Ins.Physiol., 20, 307-314 (1974)

Rembold, H.
The role of determinator for caste formation in the honeybee.
Phase and Caste Determination in Insects, ed.by M. Lüscher, 21-33 (1976)

Rembold, H.
Ernährungsstudien an Bienenlarven unter experimentellen Bedingungen. Kurzfassung
Tagung d.Arbeitsgem.d.Inst.f. Bienen, Celle
Apidologie, 1, 86 (1981)

Rhein, W.v.
Über die Entstehung des weiblichen Dimorphismus im Bienenstaate.
W.Roux Arch.Entw.Organ., 129, 601-655 (1933)

Rothenbuhler, W.C.
Behavior genetics of nest cleaning in honeybees IV. Response of F_1 and backcross generations to desease-killed brood.
Am.Zool., 4, 111-123 (1964

Rousseau, M.
Recherches sur la dose léthale médiané du fluor pour l'abeille.
Rev.Franc.Apicult., 3, 14 (1957)

Ruttner, F.
Entwicklung und gegenwärtiger Stand der Flugraumtechnologie.
Ins.Soc., 3, 279-285 (1977)

Rupeš, V.; Ždávek,J. u. Pinterova, I.
Reinvestigation of effects of diflubenzuron on the development and reproduction in susceptible and organophosphate resistant strains of the housefly.
Z.ang.Ent., 84, 328-334 (1977)

Schenke, W.
Über die Rolle des Häutungshemmstoffs DIMILIN im Waldschutz und Waldökosystem.
Anz.Schädlingskde.Pflanzensch.,Umweltsch., 52, 97-102 (1979)

Skatulla, U.
Über die Wirkung des Entwicklungshemmers DIMILIN auf Forstinsekten.
Anz.Schädlingskde.Pflanzensch. Umweltsch., 48, 146-147 (1975)

Stanger, W. u. Winterlin, W.
Residues of the insecticide Carbaryl and Monocrotophos in honeybee colonies.
J.apic.Res., 3, 131-135 (1975)

Still, G.G. u. Leopold, R.A.
The elimination of (N -C[(4-chlorophenyl) amino] carbonyl] -2,6 - difluorobenzamide) by the boll weevil
Pestic.Biochem.Physiol., 9, 304-312 (1978)

Stute, K.
Untersuchungsbericht über die Bienenschäden des Jahres 1974.
ADIZ, 8, 213-216 (1975)

Stute, K.; Boneß, M.; Brasse, D.; Drescher, W.; Dustmann, J.H,; Pinsdorf, W.; Vorwohl, G. u. Weiß, K.
Richtlinien für die Prüfung von Pflanzenbehandlungsmitteln auf Bienengefährlichkeit.
Richtlinie 23-1 d. Biol.Bundesanstalt (1980)

Taber, S. III
Influence of pollen location in the hive on its utilizationby the honeybee colony.
J.apic.Res., 12, 17-20 (1973)

Todd, F.E. u. McGregor, S.E.
Insecticides and bees.
U.S.Dept.Agr.Yearbook, 131-135 (1952)

Van Eck, W.H.
Mode of action of two benzoylphenyl ureas as inhibitors of chitin synthesis in insects.
Insect Biochem., 9, 295-300 (1979)

Verloop, A. u. Ferrell, C.D.
Benzoylphenyl ureas - a new group of larvicides interfering with chitin deposition in: Plimmer, J.R. (Ed.) Pesticide Chemistry in the 20th Century. Am.Chem.Soc.sympos. series, 37 (1977)

Vidano, C.
Indagini sulle cause di massici apicidi in areali viticoli piemontesi.
L'apicoltore mod., 67, 85-91 (1976)

Vorwohl, G.
Drei Jahre Untersuchungen über die Reben als Bienenweidepflanzen.
ADIZ, 6, (1973)

Wafa, A.K., Nahal, A.K. u. Ahmed, S.M.
The relative sensitivity of three strains of honeybees to Dieldrin, Toxaphene, DDT and Lindane.
Bull.soc.Ent.Egypte, 47, 13-23 (1963)

Wang, J.
Growth rates of young queen and worker honeybee larvae.
J.apic.Res., 4, 3-5 (1965)

Weiss, K.
Zur kastenspezifischen Ernährung der weiblichen Bienenlarve (Apis mellifera L.)
Apidologie, 2, 95-120 (1975)

Weaver, N.
Rearing honeybee larvae in the laboratory.
Science, 121, 509-510 (1955)

Welling, W.
Dynamic aspects of insect insecticide interactions.
Ann.Rev.Ent., 22, 53-78 (1977)

Wiese, I.H.
The toxicity of modern insecticides to the South African honeybee.
S.African Bee J., 6, 10-11 (1958)

Wittmann, D.
Bestimmung der LC 50 von DIMILIN 25 WP für Bienenbrut mit einem neuen Apis-Larven-Test
Z.Angew.Entomol., (1981) im Druck

Woyke, J.
Cannibalism and brood rearing efficiency in the honeybee.
J.apic.Res., 16, 84-94 (1977)

Ying Shin Peng u. Jay, S.C.
Larval rearing by worker honeybees lacking their mandibular glands.
Can.Ent., 109, 1175-1180 (1977)

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren Professoren und Dozenten:

Ch. F. Bardele, D. Bunke, G. Einsele, W. Engels, K.G. Grell, W. Harder
D. Herm, R. Knott, E. Kulzer, J. Loeschke, G. Micoleit, F. P. Möhres,
K. Pelling, W. Rähle, A. Rieker, E. Sander, R. Schönenberg, R. Schneider,
B. Schwemmle, A. Seilacher, U. Seitz, W. Seyffert, D. Sperlich, H. Tichy,
F. Westphal, K. Wöhrmann.

Lebenslauf

7.1o.1949	Geboren in Tübingen
1956 - 1961	Besuch der Volksschule in Dachau
1961 - 1971	Besuch des math. nat. Gymnasiums in Dachau
Juni 1971	Abitur
1971 - 1978	Studium der Biologie und Geologie an der Universität Tübingen
Juli 1973	Diplom Vorprüfung für Biologie an der Universität Tübingen
1974	Studium der Biologie und Chemie an der State University of New York at Stony Brook
1977 - 1978	Diplomarbeit bei Herrn Prof. Dr. W. Engels am Lehrstuhl für Entwicklungsphysiologie. Thema der Arbeit: Erste Untersuchungen zur Entwicklung eines Verfahrens für die Prüfung von Pflanzenschutzmitteln auf Bienen-Larven-Gefährlichkeit
Juli 1978	Diplom in Biologie
1978 - 1981	Doktorand am Lehrstuhl für Entwicklungsphysiologie bei Herrn Prof. Dr. W. Engels. Thema der Arbeit: Entwicklung von Testverfahren und Experimente zur Beurteilung von Insektizidwirkungen auf Bienenlarven